BIOCHEMISCHE VERÄNDERUNGEN DER MUCOPOLYSACCHARIDE IN GESUNDEN UND DIABETISCHEN HUMANEN PLAZENTEN WÄHREND DER ONTOGENESE

Gabriela Robotka

1983

Aus dem Institut für Humangenetik
der Johann Wolfgang Goethe-Universität
Frankfurt am Main
(Geschäftsführender Direktor: Prof.Dr.med. J. Švejcar)

BIOCHEMISCHE VERÄNDERUNGEN DER MUCOPOLYSACCHARIDE IN GESUNDEN UND DIABETISCHEN HUMANEN PLAZENTEN WÄHREND DER ONTOGENESE

I N A U G U R A L - D I S S E R T A T I O N

zur Erlangung des Doktorgrades der Medizin des Fachbereichs Humanmedizin der Johann Wolfgang Goethe-Universität Frankfurt am Main

vorgelegt von

Gabriela R o b o t k a

aus Tábor

Frankfurt am Main, 1983

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Dekan : Prof.Dr. H.J.Müller

Referent : Prof.Dr. J.Švejcar

Korreferent : Prof.Dr. D.Drahovsky

Tag der mündlichen Prüfung : 18. Oktober 1983

Druck: Dipa - Druck, 6000 Frankfurt, Tel. 55 61 88

Gewidmet meinen Eltern,

sowie Josef, Kytka und Pepča.

Vor allem bin ich für die Überlassung des Themas, die wertvolle Anregungen, Literaturhinweise und die freundliche Unterstützung bei der Abfassung meiner Arbeit

Herrn Prof.Dr.med. J. Švejcar

zu Dank verpflichtet. Weiter möchte ich mich bei

Frau Chr. Mohrmann

vom Institut für Humangenetik der J.W.Goethe-Universität Frankfurt herzlichst für ihre freundschaftliche Hilfsbereitschaft bedanken. Schließlich muß ich noch dem

Herrn Dr.med. Plesser

von der Universitäts-Frauenklinik für seine Hilfe bei Gewinnung der Plazenten danken.

Frankfurt am Main, im Januar 1983

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41523705_0036

I N H A L T

ABKÜRZUNGEN

VORWORT, ZIELSETZUNG

BIOCHEMIE DER MUCOPOLYSACCHARIDEN

PHYSIOLOGIE DER MUCOPOLYSACCHARIDEN

METHODIK DER MPS - BESTIMMUNG

Bestimmung der Gesamtgehaltes an MPS - Uronat

Fraktionierung

TABELLARISCHE ZUSAMMENFASSUNG DER ARBEITSERGEBNISSE

GRAPHISCHE DARSTELLUNG DER ARBEITSERGEBNISSE

DISKUSSION

SCHLUSSWORT

LITERATURVERZEICHNIS

CURRICULUM VITAE

EHRENWORTLICHE ERKLÄRUNG

A B K Ü R Z U N G E N

MPS	Mucopolysaccharide
GP	Glycoproteine
HY	Hyaluronat
C-4-S	Chondroitin-4-Sulfat
C-6-S	Chondroitin-6-Sulfat
CS	Chondroitinsulfat
KS	Keratansulfat
DS	Dermatansulfat
HE	Heparin
HS	Heparansulfat
CPC	Cetylpyridin-Chlorid
TG	Trockengewicht
SSW	Schwangerschaftswoche
MG	Mollekulargewicht
HWZ	Halbwertzeit

V O R W O R T

In den letzten Jahrzehnten ist man allgemein zu der Überzeugung gelangt, daß die genetische Grundlage des Diabetes mellitus in der überwiegenden Mehrzahl der Fälle multifaktoriell ist (16). Zum Risiko durch die Vererbung tritt für eine Diabetikerin das Risiko einer Fruchtschädigung. Mögliche pathol.-anatomische Veränderungen bei der diabetischen Schwangerschaft betreffen die Plazenta und das Kind und lassen sich nach dem Gestationsalter in drei Gruppen aufteilen :

1) Embryopathia diabetica
2) Fetopathia diabetica
3) Perinatale und postpartale Mortalität, kindliche Morbidität

Im I. Trimenom (Embryopathia diabetica) zeigt die Mißbildungsrate deutliche Abhängigkeit vom Grad der bereits bestehenden Angiopathie bei der Mutter (16). Nach (17) kann die mütterliche Stoffwechsellage zu dieser Zeit einen Einfluß auf die kindliche Mißbildungsrate haben, so daß die normoglykämische Einstellung der Mutter angestrebt werden muß.

Von Mißbildungen sind Herz- und Kreislaufsystem, das ZNS (dorsale Dysraphie, Akranie, Anenzephalie, Mikrozephalie) und die Extremitäten (Klumpfüße) bevorzugt befallen. Nach (18) spielen genetische Faktoren für die kongenitalen Anomalien überhaupt keine Rolle, weil Anomalien-Häufigkeit bei diabetischen Feten und praediabetischen Müttern gleichermaße wie bei gesunden Müttern vorkommt. Die kongenitalen Mißbildungen sind 2-4 x häufiger bei Nachkommen von diabetischen Müttern, als bei gesunden. Innerhalb der verschiedenen Rassen

wurde kein Unterschied im relativen Zuwachs der Häufigkeit von kongenitalen Anomalien bei diabetischen Müttern festgestellt.
Die diabetogene Dyshormonose der Mutter (19) bedingt intrauterine somatische Retardation zusammen mit morphologischen Veränderungen der humanen Plazenta. Auf den Zusammenhang zwischen plazentalen Reifungsstörungen und Diabetes mellitus haben (20), (21) und (22) hingewiesen. Diese verzögerten Reifungsstörungen in Form von Persistenz embryonaler Zottenstrukturen mit nachfolgender Vascularisationshemmung sind Beispiele einer embryonalen bzw. frühfetalen Entwicklungshemmung unterschiedlich großer Plazentaareale.
In den reifungshemmten Zottenbezirken wird die weitgehende "ständige Vergrößerung der Austauschfläche" ausbleiben (23), (24), was eine Verringerung der Plazentaoberfläche bedeutet (25), (26). Die Verminderung der Resorptionsoberfläche führt zu einer Schwächung der utero- plazentalen Perfusion, daraus resultiert eine Hypoxie, welche einen Wachstumreiz für die Plazenta darstellen kann (21). Die meißten diabetischen Plazenten sind schwerer als normale. Die Zunahme des Plazentagewichtes spricht dafür, daß vielmehr der kompensatorisch utero- plazentale Blutfluß einen Wachstumsreiz für die Plazenta als die Hypoxie darstellt.
Das Vorhandensein und das Ausmaß der mütterlichen diabetischen Angiopathie beeinflussen also die plazentale Vergrößerung und die Struktur. Das fetale Gewicht bewegt sich paralell zu dem Plazentagewicht. Plazentale Veränderungen können schon vor der 32 - 34 Schwangerschaftswoche auftreten. Aber auch bei Müttern mit Diabetes mellitus ohne Angiopathie können große Plazenten mit histologischer Unreife vorkommen. Bei der diabetischen Schwangerschaft beruht die

Funktionseinschränkung nicht nur auf einer Verminderung der Resorptionsoberfläche, sondern auch auf Verminderung der metabolischen Aktivität wesentlicher Anteile der scheinbar funktionstüchtigen Plazenta (27).

Die mütterliche Hyperglykämie wirkt sich diaplazentar auf das Kind aus, indem sie die fetale Insulinproduktion (mütterliches Insulin kann die Plazentarschranke nicht passieren) durch eine Hyperplasie der B- Zellen steigert. Durch die Hyperinsulinämie wird bei Feten ein unzeitgemäßes Wachstum auf Kosten der Reife verschiedener Organe erzwungen, so daß sie zu unreifen Riesenkindern heranwachsen.

Das von Feten zusammen mit dem Harn in das Fruchtwasser entleerte Insulin ist bei diabetischen Schwangerschaft bis zu 27- fach erhöht gegenüber einer gesunden Schwangerschaft.

Mütterliches Diabetes mellitus führt zur Veränderung in der Glukoseverwertung. Glukose wird auf insulinunabhängigen Wegen in höhere Polymere- wie Glykogen, MPS oder Glykoproteine metabolisiert.

Von mehreren Autoren (33), (34), (35) und (36) ist ausgesprochener Glykogenreichtum der Bindegewebszellen des Zottenstromas in der human diab. Plazenta beschrieben worden. Dieser Glykogenreichtum wurde nach (38) auch in ausgetragenen Plazenten von Ratten mit Streptocotocin induziertem Diabetes gefunden.

Die Speicherung des Glykogens verursacht Vergrößerungen der Leber und des Herzens beim Foetus. Durch die mütterliche Hyperglykämie und den fetalen Hyperinsulinismus wird die Triglycerid-Synthese stimuliert und dies führt zu einer allgemeinen Adipositas der Neugeborenen. Nicht selten haben diese Neugeborene eine teigige Haut (Ödem) und ein ungewöhnlich rotes Gesicht.

Die klinische Bedeutung der quantitativ und qualitativ unterschiedlichen Ausdehnung der Plazentaveränderungen wird einerseits durch die erhöhte perinatale Sterblichkeit der Kinder von diabetischen Müttern, anderseits durch die bei diesen Kindern vorkommenden häufigen Entwicklungs- und Differenzierungsstörungen evident (27), (28), (29), (30), (31) und (32).

Die perinatale und postpartale Mortalität ist abhängig von der Schwere und Dauer des mütterlichen Diabetes mellitus, seiner Stoffwechselführung während der Schwangerschaft und dem Ausmaß der Fetopathia diabetica. Man schätzt (18), daß über 25% der perinatalen Mortalität mit der diabetischen Erkrankung der Mutter verbunden sind.

Das Ziel meiner Untersuchung war es, mit geeigneten biochemischen Methoden den Gehalt an sauren MPS und das MPS-Fraktionierungsmuster in den Humanplazenten zu bestimmen und außerdem festzustellen, ob biochemische Veränderungen der MPS in gesunden und diabetischen Humanplazenten während der Ontogenese nachzuweisen sind.

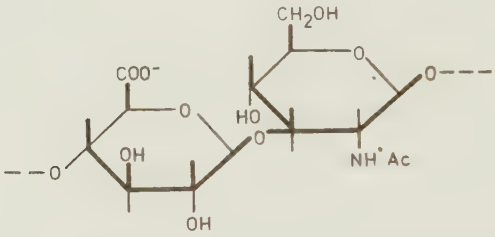
B I O C H E M I E D E R M U C O P O L Y S A C C H A R I D E N

Saure Mucopolysaccharide sind anionische Linearpolymere, die alternierend einen N- acetylierten bzw. sulfatierten Aminozucker und eine Glucuronsäure bzw. Galaktose (4) und gegebenfalls auch Estersulfatgruppen enthalten. Glucuronsäure und die Schwefelsäurereste prägen den sauren Charakter der MPS. Wegen ihres polysaccharidenCharakters und des regelmäßigen Aufbaus aus Aminozucker, haben sie den systematischen Namen- Glykosaminoglykane (2) erhalten.
Der Aufbau aus sich periodisch wiederholenden Dissaccharideiheiten, von denen 100- 1000 zu langen, unverzweigten Kettenmolekülen zusammentreten, ist ihr wichtiges Konstitutionsmerkmal. Die sauren MPS liegen in ihrer nativen Zustandsform im Gewebe nicht als freie Polysaccharide (1), (2), (3), sondern in kovalenter Bindung an spezifischen, nicht mit Kollagen identischen Proteinen vor. Jeweils 40 - 80 Ketten eines MPS mit einem M.G. von 20 - 30000 sind mit einem Protein-Molekül verknüpft. Auf diese Weise entstehen Riesenmoleküle mit einem Molekulargewicht von mehreren Millionen, die durch ihre Fähigkeit zur Bindung von Gewebswasser und Elektrolyte gezeichnet sind.
Von den sauren MPS sind 8 verschiedene Typen bekannt, die im Prinzip alle die gleiche Struktur besitzen, sich jedoch durch ihre Monosaccharid-Komponenten bzw. durch ihren Sulfatgehalt und den Typ der glykosidischen Bindung der Monosaccharidreste unterschieden.

Hyaluronsäure

Hyaluronsäure wird von Fibroblasten als hochpolymeres unverzweig-

tes gemischtes Polysaccharid synthetisiert. Man vermutet, daß die Mastzellen ebenfalls an der Synthese beteiligt sind (5).
Die kleinste Einheit ist ein Dissaccharid, das aus N-Acetylglucosamin und der Glucuronsäure zusammengesetzt ist.



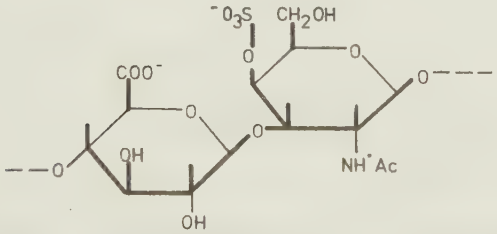
Glucuronsäure N- Acetylglucosamin

Sie kann ein MG von mehreren Millionen haben. Hyaluronsäure zeigt die Eigenschaften eines Gleitmittels. HY kann durch eine Gruppe von spezifischen Enzymen, welche in der Natur verbreitet sind, gespaltet werden. Sie heißen Hyaluronidasen, haben eine depolymerisierende Wirkung, wodurch die Viskosität der HY- Lösungen rasch gesenkt wird und eine spaltende Wirkung eintritt, welche zu der Entstehung gradzahliger Oligosaccharide führt.
Hyaluronidase wirkt als "Ausbreitungsfaktor" (spreading factor). Durch die depolymerisierende Wirkung können nämlich Fremdsubstanzen wie Tusche, kolloidale Farbstoffe, aber auch pathologische Bakterien (Pneumococcen) leicht ins Gewebe eindringen, da die Kittsubstanz aufgelöst ist. Physiologisch spielt die Hyaluronidase (im Sperma) z.B. bei der Befruchtung eine Rolle.
Die Erneuerungsgeschwindigkeit der HY ist hoch. Die biologische Halbwertzeit beträgt nur etwa 2-4 Tage. Möglicherweise spielt die Hyaluronidase auch bei der Erneuerung der HY im Gewebe eine wich-

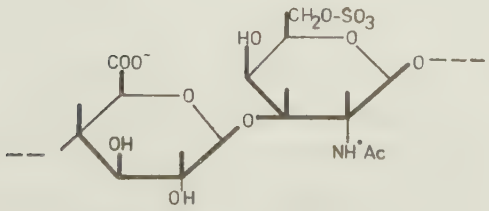
tige Rolle. Der HY - Synthesemechanismus ist bekannt (1).

Chondroitinsulfate

Als Vorläufer der Chondroitinsulfate können Chondroitin und Oligosaccharide in Frage kommen. Chondroitin besteht aus N- Acetylgalaktosamin und Glucuronsäure, enthält aber keinen Sulfatrest. Chondroitinsulfate sind sulfatierte MPS, die aus unverzweigten Ketten, von N-Acetylgalaktosamin und Glucuronsäure und Sulfatresten gebildet werden. Ihren chemischen Eigenschaften nach unterscheidet man verschiedene Sulfate : Chondroitin-4-Sulfat und Chondroitin-6-Sulfat.



Glucuronsäure N-Acetylgalaktosamin-4-Sulfat

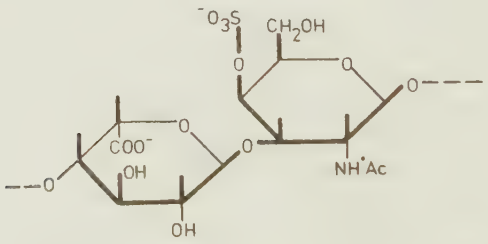


Glucuronsäure N-Acetylgalaktosamin-6-Sulfat

CS haben ein Molekulargewicht von 250 000. Beide CS können durch Hyaluronidase gespalten werden. Der Synthesemechanismus von CS ist noch nicht völlig aufgeklärt.

CS zeigen einen schnellen Umsatz. Ihre HWZ beträgt 8 Tage für die Haut, 16 Tage für Knorpel. Sie liegen in den Geweben als feste Verbindung mit Eiweß vor. Die besondere Anordnung und Verteilung ihrer anionischen Jadungen bedingen ihre Fähigkeit mit Calcium stabile Komplexe zu bilden. Im Laufe des Lebens nehmen die Chondroitinsulfate kontinuierlich zu, so daß sie zwischen dem 6. und 8. Lebensdezenium etwa 50 % der Gesamtmucopolysacchariden ausmachen (3).

Dermatansulfat

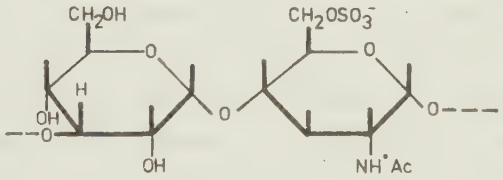


Iduronsäure N-Acetylgalaktosamin-4-Sulfat

Dermatansulfat enthält : N-Acetylgalaktosamin, Iduronsäure und Sulfat Reste. Hier ist im Vergleich zu CS die Glucuronsäure durch eine Epimerase in die isomere Iduronsäure umgewandelt. Da jedoch die Iduronsäure eine andere Dissoziationskonstante als Glucuronat aufweist, ergeben sich daraus konsequenzen für ihre Eigenschaften. Dermatansulfat kann im Gegensatz zu Chondroitinsulfat nicht durch Hyaluronidase gespalten werden. Der Proteinanteil des DS ist grö-

ßer und enthält reichlicher geladene Aminosäuren als das CS, das Gesamtmolekulargewicht aber ist niedriger. Das Molekül ist steif und gestreckt.

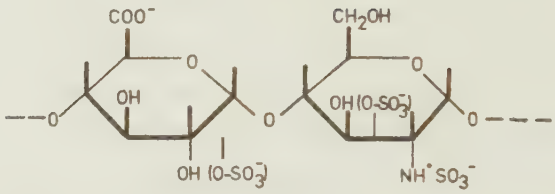
Keratansulfat



Galaktose N-Acetylglucosamin-6-Sulfat

Keratansulfat ist aus Galaktose und N-Acetylglucosamin-6-Sulfat zusammengesetzt. Aufbau und Bindungsweise sind analog dem CS, mit dem Unterschied, daß die Stellen des Glucuronats von der Galaktose eingenommen werden. Der KS-Gehalt (in der Cornea, im Knorpel, in den Zwischenwirbelbandscheiben) nimmt im Laufe des Lebens kontinuierlich zu, bis er etwa 50 % der Gesamtmucopolysaccharide ausmacht. Weil KS keine Glucuronsaäure enthält, hatte dieser Tatbestand bei unserer Analyse Konsequenzen, da die Carbazol-reaktion hauptsächlich für die Uronsäure und vor allem die Harminreaktion spezifisch ist.
Zwar reagieren Carbazol und Harmin auch mit Galaktose, doch ist die Farbreaktion hierbei wesentlich schwächer. Keratansulfat liegt gebunden an Proteinen vor. Seine Eigenschaften rücken das KS in die Nähe der Glycoproteine, von denen es chemisch schwer zu trennen ist. Glycoproteine werden auch durch die Carbazolreaktion nachgewiesen.

Heparin und Heparansulfat



Glucuronat(-2-Sulfat) Glucosamin(-1-Sulfat) -N-Sulfat

Bei Heparin sind im Gegensatz zu den übrigen MPS Aminozucker und Glucuronsäure stets in (1-4)glykosidischer Bindung, außerdem enthält es anstelle von Acetamidgruppen die Sulfonamidgruppen. Weitere Estersulfatgruppen befinden sich am C-Atom 6 und z.T. auch am C-Atom 3 des Glucosaminrestes.

Unter den MPS hat Heparin den höchsten Sulfatierunggrad, aber mit MG 16 000 das niedrigste Molekulargewicht. Neben Histamin und Serotonin wird das Heparin in den Mastzellen synthetisiert und gespeichert. Sein chemischer Aufbau ist bis heute noch nicht in allen Einzelheiten geklärt.

Durch sein stark sauren Charakter vermag es mit Proteinen salzartige Verbindungen zu bilden. Heparin ist eine natürliche, gerinnungshemmende Substanz (Antikoagulans). Heparin einerseits verhindert die Umwandlung von Prothrombin zu Thrombin, anderseits auch schon bei bereits vorhandenem Thrombin die Umwandlung von Fibrinogen zu Fibrin. Heparin spielt eine wichtige Rolle als s.g. "clearing factor" bei Lipämie. Er setzt aus dem Gewebe eine Lipoproteid-Lipase frei, die dann ins Plutplasma gelangt und durch Spaltung der Lipoproteid-Komplexe zu einer "Klärung" des Plutplasma führt. HE wirkt in vitro und in vivo.

Im Organismus wird Heparin durch eine Heparinase abgebaut.
Neben dem Heparin ist das Heparansulfat bekannt. In seinem chemischen Aufbau ist es mit dem Heparin verwandt. Der Unterschied liegt darin, daß es im Durchschnitt nur an jeder zweiten Aminogruppe des Glucosamins einen Sulfatrest, sonst jedoch einen Acetylrest trägt.

PHYSIOLOGIE DER MUCOPOLYSACCHARIDEN

Die sauren MPS haben hohe Umsatzraten. Zur Aufrechterhaltung einer konstanten Gewebekonzentration müssen Biosynthese und Abbau der MPS mit der gleichen Geschwindigkeit ablaufen. Der MPS-Stoffwechsel unterliegt einer hormonellen Kontrolle (7).

Zum Beispiel Nebennierenrinde-Hormone können in höheren Konzentrationen die MPS-Synthese hemmen. Thyroxinmangel führt zur Akkumulation der Hyaluronsäure, weil deren Abbau verzögert ist, und zu einer Abnahme des DS in der Haut. Insulin stimuliert die Polysaccharid- und Eiweiß synthese. Beim enzymatischen Abbau der Mucopolysaccharid-Protein-Komplexe sind verschiedene Proteasen, Peptidasen und Glykosidasen, beim Abbau der sulfatierten MPS zusätzlich Sulfatasen beteiligt. So weit bekannt, sind es lysosomale Enzyme, die alle ein pH- Optimum zwischen 4-5 besitzen. Ob der enzymatische Abbau der MPS-Proteine vollständig oder teilweise extrazellulär verläuft, ist noch ungeklärt.

Die MPS binden auf Grund ihres hohen effektiven hydrodynamischen Volumens und ihrer extrazellulären Lokalisation einen großen Teil Extrazellulärwassers im Organismus. Sie bilden eine Permeabilitätsbarriele, die den extrazellulären Stofftransport kontrollieren kann.

M E T H O D I K D E R MPS - B E S T I M M U N G

Untersuchungsmaterial

Für die Analysen standen mir 41 Plazenten zur Verfügung. Das Alter der Plazenten wurde in den meisten Fällen aus dem Datum der letzten Menstruation festgelegt. In einigen Fällen wurden die Altersangaben dann noch durch Sonografie-Werte korrigiert.

Extraktion der MPS aus den Geweben

Reinigung der Proben

Die frisch gewonnene Plazenta wurde bis zur Weiterverarbeitung im Labor in physiol. NaCl transportiert. Dann wurde das plazentare Gewebe im 0,9 % NaCl mehrmals gründlichst gewaschen und mechanisch fein zerkleinert. Eine feine Zerkleinerung ist wichtig, um für den nachfolgenden enzymatischen Digestionsvorgang eine möglichst große Angriffsfläche zu bieten. Um alle Möglichkeiten einer unkontrollierten Veränderung der Grundsubstanz durch Extraktion oder mikrobielle Verdauungvorgänge auszuschließe, begann man spätestens 6 Std. nach der Gewinnung mit der Bearbeitung.

Dehydrierung und Entfettung der Probe

Die Probe wurde mehrmals in Aceton gewaschen und zur Dehydrierung und Entfettung über Nacht in eine 1:1 Äther-Aceton-Gemisch gegeben.

Am nächsten Morgen wurde der Probe noch einmal für 30 Minuten ein neues Äther-Aceton-Gemisch zugefügt, danach wurde sie ca. 1/2 Stunde im Trockenschrank nachgetrocknet (bei 65°C) und dann im Exsikkator aufbewahrt.

Trockengewichtsbestimmung

Die Bestimmung des Trockengewichts, jeweils über 100 mg erfolgte auf der Präzisionswaage.

Denaturierung der Probe

Die getrocknete Probe wurde mit 1-3 ml 0,5 M Na-Acetat-Puffer (CH_3COONa, pH 7,5) versetzt. Die Suspension wurde dann 20 Minuten im Wasserbad gekocht und anschließend auf Zimmertemperatur abgekühlt.

Proteolytische Verdauung

Nach Dehydrierung, Entfettung und Denaturierung erfolgt eine Proteolyse. Dazu wird die Probe mit Pronase B versetzt. Die Pronase B (pH 7-8) ist eine sehr starke Protease aus Streptomyces griseus, welche alle Eiweiße spaltet und ein Wirkungsspektrum von Endo- und Exopeptidasen besitzt. Zur Einleitung des Verdauungsprozesses wurde die Probe mit der ersten Menge Pronase B (10 µg Enzym/ mg TG) versetzt, nicht gerührt und verschlossen für 24 Std. in den Wärme-

schrank (65°C) gestellt. Danach wurde die Probe geöffnet und mit Glasstäben gerührt. Nach 2 Stunden erfolgte die Zugabe einer zweiten Menge Pronase B (gleiche Menge wie beim erstenmal). Der fraktionierte Pronase-Zusatz fördert den vollständigen Ablauf der proteolytischen Spaltung.

Nach 24 Stunden wird die Probe im Leitungswasser abgekühlt und mit 100 %iger Trichloressigsäure versetzt und für 10 Minuten stehen gelassen. Durch Zugabe von Trichloressigsäure wird das unverdaute Protein gefällt. Danach wird das Gemisch in Zentrifugengläser umgefüllt, eine Messerspitze Kaolin zugesetzt und 5 Minuten zentrifugiert. Dann wird der Überstand abgefangen. Um restliche MPS aus dem Rückstand zu entfernen, fügt man 1 ml 5 %ige Trichloressigsäure hinzu, rührt kräftig und zentrifugiert erneut 5 Minuten. Das Waschwasser wird dem Überstand beigefügt. In diesem gepoolten Überstand befinden sich jetzt quantitativ die gesuchten MPS.

Fällung, Reinigung und Trocknung der MPS

Fällung : Die Probe wird mit 3 Vol. 5 %igem Kaliumacetat in 95 %igem Äthanol gefällt. Zur Bindung von zentrifugierbaren MPS-Molekülkomplexen ist mindestens eine Zeitspanne von 16 Std. notwendig. Die Probe wird umgerührt und über Nacht in den Kühlschrank (+4°C) gestellt. Am nächsten Morgen werden die Präzipitate abzentrifugiert.

Reinigung : Die abzentrifugierten Präzipitate werden stufenweise in 5 %iger wässriger Kaliumacetatlösung gelöst und unlösliche Rückstände werden duurch scharfes Zentrifugieren entfernt. Die MPS werden dann erneut durch 3 Vol. 95 %igen

Äthanol gefällt und nochmals für 1 Std. stehengelassen.

Trocknung : Das abzentrifugierte Präzipität wird in 2 ml 95 %igem Äthanol aufgewirbelt, nach Zugabe von 2 ml absoluten Äthanol abzentrifugiert, in etwa 3 ml Äther getrocknet. Danach noch 30 Minuten bei 65°C im Trockenschrank wird nachgetrocknet. So wird ein "reines MPS-Pulver gewonnen.

Bestimmung d. Gesamtgehaltes am MPS - Uronat

Für die Bestimmung des MPS- Uronats stehen 3 Methoden zur Verfügung

1) Carbazol-reaktion nach Bitter und Muir (11)
2) Harmin-reaktion (13)
3) Meta-hydroxydiphenil-reaktion (14).

Alle drei Methoden benutzen die Fähigkeit von Uronsäure und Galaktose der MPS mit bestimmten Substanzen einen Farbkomplex zu bilden.

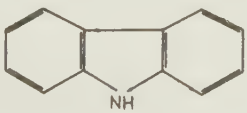
1) Carbazol-reaktion

Als Eichsubstanz dient Chondroitin-4-Sulfat. 1 mg hochgereinigtes C-4-S mit einem Gehalt von ca. 30 % Glucuronat wird in 1 ml 0,075 M NaCl gelöst. Man nimmt 5 verschiedene Mengen (50 - 250 µl) in Doppelansätze. Die Bestimmung der Gesamt-MPS in den Proben : Dazu wird eine geeignete Menge des gereinigten MPS-Pulvers (nach empirischen Erfahrungen) in 0,075 M NaCl gelöst. Trübungen werden durch scharfes zentrifugieren beseitigt. Von dieser Lösung wird 50 µl genommen, mit Aqua dest. auf 1 ml aufgefüllt und weiter wie folgt verarbeitet. Zu 1 ml

Leerwert, Eichwert bzw. Probe gibt man im Eisbad 5 ml Natrium-tetraborat (0,025 M $Na_2B_4O_7 \cdot 10\ H_2O$) in konz. H_2SO_4, nach Vermischung werden die Proben 10 Minuten bei 100 °C im Wasserbad gekocht.

$$\text{Uronsäure} + H_2SO_4 \xrightarrow{\text{Erhitzen}} \text{2-Formyl-furonsäure}$$

Durch kochen kommt es zum Abbau der Uronsäuremoleküle. Unter starkem Wasserentzug ensteht ein Chromogen, welches mit Carbazol reagiert. Carbazol ist Di-benzopyrol (reagiert nicht nur mit Uronsäure und Galaktose sondern auch mit Glykoproteiden).



$C_{12}H_9N$

Natriumtetraborat verstärkt als positiven Effekt die Farbreaktion, als negativen Effekt führt es zur Störung der Reaktion durch die Neutral-zucker (Galaktose, Mannose, Fuccose, Xylose). Nach 10 Minuten Kochen erfolgt eine sofortige Abkühlung im Eisbad, da sonst bei der nächsten Reaktion kein vollständiger Farbkomplex entstehen könnte.

Nach Zusatz von 0,2 ml Carbazollösung im Äthanol wird gut gemischt, weitere 15 Minuten gekocht und dann auf Zimmertemperatur abgekühlt, wobei ein rot-violetter Farbkomplex entsteht.

$$\text{2-Formyl-furonsäure} + \text{Carbazol} \longrightarrow \text{Farbkomplex}$$

Anschließend wird die Extinktion bei 535 nm Wellenlänge photometrisch gegen den Leerwert gemessen und mit Hilfe der Eichkurve die Uronatmenge rechnerisch bestimmt.

2) Harmin-reaktion

Als Eichsubstanz benutzt man ebenfalls C-4-S (1 mg in 0,075 M NaCl gelöst). 50 - 250 µl der Eichlösung werden jeweils auf 1 ml mit Aqua dest. aufgefüllt. Das gereinigte MPS-Pulver wird die Eichsubstanz in 0,075 M NaCl gelöst. Trübungen werden abzentrifugiert. Für die Gesamt-Bestimmung werden nach empirischen Erfahrungen 50 µl eingesetzt.

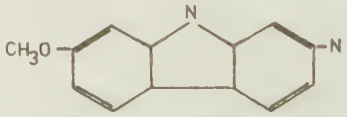
Zu 1 ml Leerwert (Aqua dest.), Eichwert bzw. Probe gibt man im Eisbad 5 ml H_2SO_4 mit Tetraborat hinzu, mischt und kocht es 10 Minuten bei 100 °C im Wasserbad.

$$\text{Uronsäure} + H_2SO_4 \xrightarrow{\text{Erhitzen}} \text{2-Formyl-furonsäure}$$

Danach läßt man die Ansätze bei Zimmertemperatur 20 Minuten abkühlen. Nach diesem Intervall werden alle Proben mit 0,2 ml Harmin im 0,2 %igen Äthanol versetzt, kräftig gemischt und weitere 10-30 Minuten bei Zimmertemperatur stehen gelassen.

$$\text{2-Formyl-furonsäure} + \text{Harmin} \longrightarrow \text{Farbkomplex}$$

Harmin ist ein Pyridoindol, ähnlich wie Carbazol. Bei Zimmertemperatur stören die Neutral-zucker diese Reaktion nur sehr schwach.



$C_{13}H_{12}N_2O$

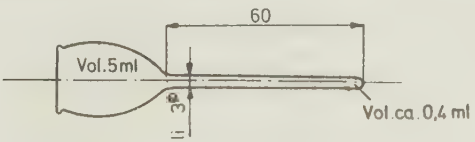
Die rote Farbe der Probe wird bei 530 nm Wellenlänge gegen den Leerwert gemessen und mit Hilfe der Eichkurve die Uronatmenge rechnerisch bestimmt.

3) Meta-hydroxidiphenyl-reaktion

Meta-hydroxydiphenil ist wahrscheinlich das spezifischte Reagenz für die Uronsäure. Die Neutral-zucker spielen hier keine Rolle, weil ihre Reaktion mit Meta-Hydroxydiphenyl sehr schwach ist. Die Farbreaktion entsteht nur bei Zimmertemperatur, da sie aber instabil ist, benutzt man diese Reaktion nicht.
In Hinsicht auf den Arbeitsaufwand und die Genauigkeit ist deshalb die Harmin-reaktion am besten geeignet.

F r a k t i o n i e r u n g

Die Mikrofraktionierung ist der entscheidenste Schritt der Analyse, denn es vollzieht sich nun mehr die qualitative und quantitative Trennung des MPS-Gemisches in seine Komponenten.
Die Details dieser analytischen Methode wurde von Švejcar et Robertson (15) auf der Grundlage von Antonopoulos u. Mitarbeitern (12) entwickelt. Es beruht darauf, daß die MPS mit Cetylpyridinchlorid (CPC) in einer Zellulosesuspension gefüllten Säule unlösliche Komplexe bilden, aus denen sie durch bestimmte Spüllösungen schrittweise eluiert werden. Für die Fraktionierung werden Säulen aus KPG-Glas verwendet (siehe Abbildung). Diese Säule ermöglicht auch Arbeiten mit sehr geringen Mengen.



Das untere Ende der Säule wird mit Glaswolle verstopft, in ein Reagenzglas mit Wasser gestellt und unter Vermeidung des Eindringen von Luft (Pasteurpipetten benutzen) mit 1 ml Zellulosesuspensionslösung gefüllt. Wenn man einen Luftdruck von 50 - 100 mm Hg dabei benutzt, dann verteilt sich die Zellulose gleichmäßig. Danach wird der Trichter mit Aqua dest. gereinigt, die Säule auf ein trockenes Reagenzglas aufgesetzt und mit 3,5 ml 1 %igem CPC gefüllt, die Säulenpackung wird mit CPC gesättigt und anschließend werden die Proben aufgetragen. Die Fraktionierung wird im Brutschrank bei 27 °C vorgenommen, um die Löslichkeit der MPS - CPC Komplexe nicht zu beeinflussen und die Kristallbildung in den Lösungen zu verhindern. Durch unterschiedliche Fraktionslösungen werden die einzelnen MPS-Fraktionen aus der Zellulosesäule eluiert und dadurch getrennt.

Fraktionierungslösungen (15) :

Fraktion 1	1 %iges CPC in einer Menge, die die aufgetragene Probe zu 1 ml ergänzt im Eluat : KS + Glykoproteine
Fraktion 2	1 ml 0,3 M Nacl in 0,05 %igem CPC im Eluat : HY
Fraktion 3	1 ml 0,3 M $MgCl_2$ in 0,05 %igem CPC im Eluat : HS Spülung mit 0,5 ml 0,05 %igem CPC

Fraktion 4	1 ml folgender Lösung :
	40 ml n-Propanol + 20 ml Methanol +
	+ 1,5 ml Eisessig + 0,5 g CPC,
	gelöst in 100 ml Aqua dest.
	im Eluat : C-4-S
	Spülung mit 0,8 ml 0,05 %igem CPC
	anschließend Spülung mit
	0,4 ml 0,05 %igem CPC
Fraktion 5	1 ml 0,75 M $MgCl_2$ in 0,05 %iger CPC
	mit 0,6 %iger Essigsäure
	im Eluat : C-6-S
	Spülung mit 0,5 ml 0,05 %igem CPC
Fraktion 6	1 ml 0,75 M $MgCl_2$ in 0,05 %iger CPC
	im Eluat : DS
Fraktion 7	1 ml 1,25 M $MgCl_2$
	im Eluat : HE + KS

In der Fraktion 1 - Keratansulfat als einziges aus den sauren MPS enthält statt Uronsäure Galaktose. Galaktose + Carbazol ergeben die Farbintensität, die 15 % der Farbintensität Uronsäure + Carbazol ausmacht. Dies gilt ebenso für andere Hexosen aus Glykoproteinen, die in dem Eluat der Fraktion 1 erscheinen.

Die Fraktion 4 wird im Wasserbad getrocknet, wobei das Propanol - Methanol-Gemisch, das bei der Fraktionierung als Lösungsmittel benutzt wurde, ausgetrieben wird. Dies ist notwendig, um bei der folgen-

den Zugabe von H_2SO_4 eine Reaktion zwischen konz. H_2SO_4 und Propanol, die zu einen braunschwarzen Verfärbung führt, zu verhindern. Der getrockneten Fraktion 4 wird sodann 1 ml Aqua dest. als Lösungsmittel zugesetzt.

In der Fraktion 7 wird durch die hohe $MgCl_2$ Konzentration der Ertrag der Farbintensität um ca. 15 % herabgesetzt, aber in der Berechnung wirddiese Erfahrungstatsache nicht berücksichtigt.

Fraktionierungsergebnisse

Die gewonnenen Eluate, in denen die MPS-Fraktionen getrennt vorliegen werden dann nach der Carbazol und Harmin-Reaktion quantitativ bestimm Die Fraktionierung ist eine zeitaufwendige Analyse-Methode, aber sie ermöglicht eine relativ saubere und verläßliche Trennung der MPS-Frak onen und ihre quantitative Bestimmung, so daß differenzierte Aussagen zum Gesamt-MPS-Gehalt und zum MPS-Verteilungsmuster von analysierten Geweben getroffen werden können (44). So sind in den vergangenden Jahren im gleichen Institut vielfältige MPS-Untersuchungen mit interessanten Fragestellungen und reichhaltigen Ergebnissen vorgenommen worden (6), (9), (10).

Die in den Ergebnistabellen aufgeführten Konzentrationsangaben für die MPS geben nicht den Gehalt an MPS, sondern den Gehalt an MPS-Uronat wieder. Dieser Wert entspricht ca 30 % des realen MPS-Gehaltes (7). In den Ergebnistabellen sind die Konzentrationen des Gesamt-MPS-Uronat und für die einzelne MPS-Fraktionen in Mikrogramm MPS-Uronat pro eingesetzten Milligramm Trockengewicht (µg/mg TG) angegeben. Bei den MPS-Fraktionen wird zusätzlich der prozentualle Anteil am MPS-Gesamtmisch angegeben.

TABELLARISCHE ZUSAMMENFASSUNG DER ARBEITSERGEBNISSE

Schwangerschafts Dauer				Gesamt-MPS	Fraktionen absolut						
Nr.	5. SSW	Reaktion	n	µgMPS Uronat / mg TG	1 GP+KS	2 HY	3 HS	4 C-4-S	5 C-6-S	6 DS	7 HE
1	Plazenta-Interrup.grav.	Carbazol	1	7,1	2,77	1,06	0,57	0,07	0,07	1,92	0,14
		Harmin	-	-	-	-	-	-	-	-	-
		Carbazol	1	7,1	2,77	1,06	0,57	0,07	0,07	1,92	0,14
		Harmin	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Schwangerschafts Dauer				Gesamt-MPS	Fraktionen %						
Nr.	5. SSW	Reaktion	n	µgMPS Uronat / mg TG	1 GP+KS	2 HY	3 HS	4 C-4-S	5 C-6-S	6 DS	7 HE
1	Plazenta-Interrup.grav.	Carbazol	1		39	15	8	1	8	27	2
		Harmin	-		-	-	-	-	-	-	-
		Carbazol	1		39	15	8	1	8	27	2
		Harmin	-		-	-	-	-	-	-	-

Schwangerschafts Dauer				Gesamt-MPS	Fraktionen absolut						
Nr.	6. SSW	Reaktion	n	µgMPS Uronat / mg TG	1 GP+KS	2 HY	3 HS	4 C-4-S	5 C-6-S	6 DS	7 HE
2	Plazenta-Interrup.grav. Fetus 1,5 cm lang	Carbazol	1	7,6	2,7	1,7	1,2	0,5	0,9	0,3	0,1
		Harmin	-	-	-	-	-	-	-	-	-
3	Plazenta-Abortus tubarius Fetus 2,1 cm lang	Carbazol	1	9,6	1,9	3,2	1,3	0,7	1,3	0,7	0,5
		Harmin	-	-	-	-	-	-	-	-	-
		Carbazol	2	8,6	2,3	2,45	1,25	0,6	1,1	0,5	0,3
		Harmin	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Schwangerschafts Dauer				Gesamt-MPS	Fraktionen %						
Nr.	6. SSW	Reaktion	n	µgMPS$_{Uronat}$ / mg TG	1 GP+KS	2 HY	3 HS	4 C-4-S	5 C-6-S	6 DS	7 HE
2	Plazenta-Interrup.grav. Fetus 1,5 cm lang	Carbazol	1		38	22	16	6	12	4	2
		Harmin	-		-	-	-	-	-	-	-
3	Plazenta-Abortus tubarius Fetus 2,1 cm lang	Carbazol	1		20	33	14	7	14	7	5
		Harmin	-		-	-	-	-	-	-	-
		Carbazol	2		29	27,5	15	6,5	13	5,5	3,5
		Harmin	-		-	-	-	-	-	-	-

Schwangerschafts Dauer				Gesamt-MPS	Fraktionen absolut						
Nr.	7. SSW	Reaktion	n	µgMPS Uronat / mg TG	1 GP+KS	2 HY	3 HS	4 C-4-S	5 C-6-S	6 DS	7 HE
4	Plazenta-Interrup.grav. Fetus 3,5 cm lang	Carbazol	1	4,4	0,66	0,97	0,66	0,4	0,97	0,57	0,17
		Harmin	-	-	-	-	-	-	-	-	-
5	Plazenta-4x Interrup.grav.	Carbazol	1	6,25	3,13	0,62	0,75	0,19	0,62	0,75	0,19
		Harmin	1	3,42	0,96	0,34	0,48	0,24	0,31	0,79	0,30
6	Plazenta-Interrup.grav.	Carbazol	1	6,50	1,76	0,78	1,05	0,46	1,05	1,05	0,35
		Harmin	1	4,10	0,49	0,41	0,57	0,41	0,41	1,40	0,41
		Carbazol	3	5,7	1,85	0,79	0,82	0,35	0,88	0,79	0,24
		Harmin	2	3,8	0,72	0,37	0,52	0,32	0,36	1,09	0,35

Schwangerschafts Dauer				Gesamt-MPS	Fraktionen %						
Nr.	7. SSW	Reaktion	n	µgMPS Uronat / mg TG	1 GP+KS	2 HY	3 HS	4 C-4-S	5 C-6-S	6 DS	7 HE
4	Plazenta-Interrup.grav. Fetus 3,5 cm lang	Carbazol	1		15	22	15	9	22	13	4
		Harmin	-		-	-	-	-	-	-	-
5	Plazenta -4x Interrup.grav.	Carbazol	1		50	10	12	3	10	12	3
		Harmin	1		28	10	14	7	9	23	9
6	Plazenta-Interrup.grav.	Carbazol	1		27	12,5	16	7,1	16	16	5,4
		Harmin	1		12	10	14	10	10	34	10
		Carbazol	3		30,6	14,8	14,5	6,4	16,0	13,8	4,1
		Harmin	2		20,0	10,0	14,0	8,5	9,5	28,5	9,5

Schwangerschafts Dauer				Gesamt-MPS	Fraktionen absolut						
Nr.	8. SSW	Reaktion	n	µgMPS Uronat / mg TG	1 GP+KS	2 HY	3 HS	4 C-4-S	5 C-6-S	6 DS	7 HE
7	Plazenta-Abortus spontaneus	Carbazol	1	5,23	1,15	0,58	0,47	0,47	0,78	1,47	0,31
		Harmin	1	4,43	5,50	0,49	0,40	0,31	0,64	1,86	0,49
8	Plazenta -3x Interrup.grav.	Carbazol	1	7,60	3,27	0,99	0,68	0,38	0,99	0,99	0,30
		Harmin	1	5,15	0,93	0,82	0,72	0,52	0,41	1,29	0,46
9	Plazenta-Interrup.grav.	Carbazol	1	5,01	1,56	0,65	0,75	0,65	0,75	0,40	0,25
		Harmin	1	2,74	0,47	0,27	0,41	0,47	0,27	0,58	0,27
		Carbazol	3	5,95	1,99	0,74	0,63	0,50	0,84	0,95	0,28
		Harmin	3	4,10	2,30	0,53	0,51	0,43	0,44	1,24	0,41

Schwangerschafts Dauer				Gesamt-MPS	Fraktionen %						
Nr.	8. SSW	Reaktion	n	µgMPS Uronat / mg TG	1 GP+KS	2 HY	3 HS	4 C-4-S	5 C-6-S	6 DS	7 HE
7	Plazenta-Abortus spontaneus	Carbazol	1		22	11	9	9	15	28	6
		Harmin	1		5,5	11	9	7	14,5	42	11
8	Plazenta -3x Interrup.grav.	Carbazol	1		43	13	9	5	13	13	4
		Harmin	1		18	16	14	10	8	25	9
9	Plazenta-Interrup.grav.	Carbazol	1		31	13	15	13	15	8	5
		Harmin	1		17	10	15	17	10	21	10
		Carbazol	3		32	12,3	11	9	14,3	16,3	5
		Harmin	3		13,5	12,3	12,6	11,3	10,8	29,3	10

Schwangerschafts Dauer				Gesamt-MPS	Fraktionen absolut						
Nr.	9. SSW	Reaktion	n	µgMPS Uronat / mg TG	1 GP+KS	2 HY	3 HS	4 C-4-S	5 C-6-S	6 DS	7 HE
10	Plazenta-Abortus spontaneus Fetus 5,5 cm lang	Carbazol	1	3,7	1,25	0,45	0,60	0,48	0,45	0,40	0,15
		Harmin	-	-	-	-	-	-	-	-	-
11	Plazenta-Interrup.grav.	Carbazol	1	4,50	1,17	0,67	0,59	0,18	0,99	0,81	0,09
		Harmin	1	3,96	0,33	0,67	0,49	0,33	0,49	1,31	0,34
12	Plazenta-Interrup.grav.	Carbazol	1	9,10	1,37	1,00	1,18	1,18	1,55	2,46	0,36
		Harmin	1	7,15	0,57	0,75	0,93	0,75	0,75	2,65	0,75
		Carbazol	3	5,70	1,26	0,70	0,79	0,61	0,99	1,22	0,20
		Harmin	2	5,55	0,45	0,71	0,71	0,54	0,62	1,98	0,54

Schwangerschafts Dauer				Gesamt-MPS	Fraktionen %						
Nr.	9. SSW	Reaktion	n	µgMPS Uronat / mg TG	1 GP+KS	2 HY	3 HS	4 C-4-S	5 C-6-S	6 DS	7 HE
10	Plazenta-Abortus spontaneus Fetus 5,5 cm lang	Carbazol	1		35	12	15	10	12	11	5
		Harmin	-		-	-	-	-	-	-	-
11	Plazenta-Interrup.grav.	Carbazol	1		26	15	13	4	22	18	2
		Harmin	1		8,3	17	12,5	8,3	12,5	33	8,4
12	Plazenta-Interrup.grav.	Carbazol	1		15	11	13	13	17	27	4
		Harmin	1		8	10,5	13	10,5	10,5	37	10,5
		Carbazol	3		25,3	12,6	13,6	9,0	17,0	18,6	3,6
		Harmin	2		8,3	13,7	12,7	9,4	11,5	35	9,4

Schwangerschafts Dauer				Gesamt-MPS	Fraktionen absolut						
Nr.	11. SSW	Reaktion	n	µgMPS Uronat / mg TG	1 GP+KS	2 HY	3 HS	4 C-4-S	5 C-6-S	6 DS	7 HE
13	Plazenta-45J. Interrup.grav. Fetus 6 cm lang	Carbazol	1	3,7	0,90	0,65	0,60	0,10	0,65	0,40	0,40
		Harmin	-	-	-	-	-	-	-	-	-
14	Plazenta-Interrup.grav. Fetus 3,8 cm lang	Carbazol	1	3,4	0,44	0,31	0,31	0,13	1,60	0,61	0,00
		Harmin	-	-	-	-	-	-	-	-	-
		Carbazol	2	3,55	0,67	0,48	0,45	0,07	1,12	0,50	0,20
		Harmin	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Schwangerschafts Dauer				Gesamt-MPS	Fraktionen %						
Nr.	11. SSW	Reaktion	n	µgMPS Uronat / mg TG	1 GP+KS	2 HY	3 HS	4 C-4-S	5 C-6-S	6 DS	7 HE
13	Plazenta-45J. Interrup.grav. Fetus 6 cm lang	Carbazol	1		24	18	16	3	18	10	11
		Harmin	-		-	-	-	-	-	-	-
14	Plazenta-Interrup.grav. Fetus 3,8 cm lang	Carbazol	1		13	9	9	4	47	18	0,o
		Harmin	-		-	-	-	-	-	-	-
		Carbazol	2		18,5	13,5	12,5	3,5	32,5	14	5,5
		Harmin	-		-	-	-	-	-	-	-

Schwangerschafts Dauer				Gesamt-MPS	Fraktionen absolut						
Nr.	12. SSW	Reaktion	n	µgMPS Uronat / mg TG	1 GP+KS	2 HY	3 HS	4 C-4-S	5 C-6-S	6 DS	7 HE
15	Plazenta-28 J Interrup.grav.	Carbazol	1	3,9	0,4	0,8	0,5	0,3	0,7	1,1	0,1
		Harmin	-	-	-	-	-	-	-	-	-
16	Plazenta-Mutter depresiv Interrup.grav. Fetus 7,5 cm lg.	Carbazol	1	3,5	1,2	0,8	0,6	0,2	0,3	0,3	0,1
		Harmin	-	-	-	-	-	-	-	-	-
17	Plazenta-Interrup.grav. fast keine zotten, blasig	Carbazol	1	8,1	1,94	0,81	0,65	0,16	1,7	2,35	0,49
		Harmin	-	-	-	-	-	-	-	-	-
18	Plazenta-Abortus spontaneus Fetus 6,5 cm lang	Carbazol	1	3,4	0,75	0,80	0,45	0,30	0,35	0,55	0,20
		Harmin	-	-	-	-	-	-	-	-	-
		Carbazol	4	4,72	1,07	0,80	0,55	0,24	0,76	1,07	0,22
		Harmin	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Schwangerschafts Dauer				Gesamt-MPS	Fraktionen %						
Nr.	12. SSW	Reaktion	n	µgMPS Uronat / mg TG	1 GP+KS	2 HY	3 HS	4 C-4-S	5 C-6-S	6 DS	7 HE
15	Plazenta-28 J Interrup.grav.	Carbazol	1		10	21	12	7	19	28	3
		Harmin	-		-	-	-	-	-	-	-
16	Plazenta-Mutter depresiv Interrup.grav. Fetus 7,5 cm lang	Carbazol	1		34	23	17	7	8	8	3
		Harmin	-		-	-	-	-	-	-	-
17	Plazenta-Interrup.grav. fast keine zotten, blasig	Carbazol	1		24	10	8	2	21	29	6
		Harmin	-		-	-	-	-	-	-	-
18	Plazenta-Abortus spontaneus Fetus 6,5 cm lang	Carbazol	1		22	24	13	9	10	16	6
		Harmin	-		-	-	-	-	-	-	-
		Carbazol	4		22,5	19,5	12,5	6,24	14,5	20,25	4,5
		Harmin	-		-	-	-	-	-	-	-

Schwangerschafts Dauer				Gesamt-MPS	Fraktionen absolut						
Nr.	13. SSW	Reaktion	n	µgMPS Uronat / mg TG	1 GP+KS	2 HY	3 HS	4 C-4-S	5 C-6-S	6 DS	7 HE
19	Plazenta- 30 J. Sectio parva Taubheit, M. Boeck I. Kind 1963 II. Kind-Fehlgeb. III. Kind-Sectio	Carbazol	1	3,5	1,1	0,5	0,4	0,3	0,3	0,3	0,2
		Harmin	-	-	-	-	-	-	-	-	-
20	Plazenta- Interrup.grav. Diab.mellitus Fetus 9,2 cm lang	Carbazol	1	3,1	0,9	0,6	0,6	0,3	0,4	0,3	0,0
		Harmin	-	-	-	-	-	-	-	-	-
21	Plazenta- Interrup.grav.	Carbazol	1	4,21	0,67	0,89	0,97	0,38	0,59	0,50	0,21
		Harmin	1	2,88	0,29	0,52	0,66	0,37	0,45	0,45	0,14

Schwangerschafts Dauer				Gesamt-MPS	Fraktionen absolut						
Nr.	13. SSW	Reaktion	n	µgMPS Uronat / mg TG	1 GP+KS	2 HY	3 HS	4 C-4-S	5 C-6-S	6 DS	7 HE
22	Plazenta-interrup.grav.	Carbazol	1	8,93	0,98	1,43	1,25	0,53	1,79	2,59	0,36
		Harmin	1	6,94	0,35	1,04	0,83	0,56	0,76	2,78	0,62
		Carbazol	4	4,93	0,91	0,85	0,80	0,37	0,77	0,92	0,19
		Harmin	2	4,91	0,32	0,78	0,74	0,46	0,60	1,61	0,38

Schwangerschafts Dauer				Gesamt-MPS	Fraktionen %						
Nr.	13. SSW	Reaktion	n	µgMPS Uronat / mg TG	1 GP+KS	2 HY	3 HS	4 C-4-S	5 C-6-S	6 DS	7 HE
19	Plazenta- 30 J. Sectio parva Taubheit, M. Boeck, I.Kind 1963 II.Kind-Fehlgeb. III.Kind Sectio	Carbazol	1		35	17	14	8	11	11	4
		Harmin	-		-	-	-	-	-	-	-
20	Plazenta- Interrup.grav. Diab.mellitus Fetus 9,2 cm lang	Carbazol	1		29	20	18	9	12	11	1
		Harmin	-		-	-	-	-	-	-	-
21	Plazenta- Interrup.grav.	Carbazol	1		16	21	23	9	14	12	5
		Harmin	1		10	18	23	13	15,5	15,5	5

Schwangerschafts Dauer				Gesamt-MPS	Fraktionen %						
Nr.	13. SSW	Reaktion	n	µgMPS Uronat / mg TG	1 GP+KS	2 HY	3 HS	4 C-4-S	5 C-6-S	6 DS	7 HE
22	Plazenta-Interrup.grav.	Carbazol	1		11	16	14	6	20	29	4
		Harmin	1		5	15	12	8	11	40	9
		Carbazol	4		22,75	18,5	17,25	8,0	14,25	15,75	3,5
		Harmin	2		7,5	17,5	17,5	10,5	13,2	27,75	2,0

Schwangerschafts Dauer				Gesamt-MPS	Fraktionen absolut						
Nr.	14. SSW	Reaktion	n	$\frac{\mu g MPS_{Uronat}}{mg\ TG}$	1 GP+KS	2 HY	3 HS	4 C-4-S	5 C-6-S	6 DS	7 HE
23	Plazenta-Interrup.grav. Fetus 8,5 cm lang	Carbazol	1	2,96	0,41	0,56	0,53	0,47	0,41	0,41	0,17
		Harmin	1	2,48	0,17	0,45	0,35	0,65	0,27	0,47	0,12
24	Plazenta- 18 J. Interrup.grav. Berechng.:16SSW Sonographie: 14 SSW	Carbazol	1	2,04	0,33	0,41	0,37	0,22	0,28	0,33	0,10
		Harmin	-	-	-	-	-	-	-	-	-
25	Plazenta- 29 J. Abortus spontaneus Fetus 10 cm lang	Carbazol	1	2,20	0,57	0,40	0,35	0,22	0,26	0,31	0,09
		Harmin	-	-	-	-	-	-	-	-	-
26	Plazenta - 36 J. Sectio parva Fetus 9,5 cm lang	Carbazol	1	2,30	0,67	0,59	0,37	0,18	0,28	0,18	0,03
		Harmin	-	-	-	-	-	-	-	-	-
		Carbazol	4	2,37	0,49	0,49	0,40	0,27	0,30	0,31	0,09
		Harmin	1	2,48	0,17	0,45	0,35	0,65	0,27	0,47	0,12

Schwangerschafts Dauer				Gesamt-MPS	Fraktionen %						
Nr.	14. SSW	Reaktion	n	µgMPS Uronat / mg TG	1 GP+KS	2 HY	3 HS	4 C-4-S	5 C-6-S	6 DS	7 HE
23	Plazenta-Interrup.grav. Fetus 8,5 cm lang	Carbazol	1		14	19	18	16	14	14	5
		Harmin	1		7	18	14	26	11	19	5
24	Plazenta-18 J. Interrupt.grav. Berechng.16SSw Sonographie 14 SSW	Carbazol	1		16	20	18	11	14	16	6
		Harmin	-		-	-	-	-	-	-	-
25	Plazenta-29 J. Abortus spontaneus Fetus 10 cm lang	Carbazol	1		26	18	16	10	12	14	4
		Harmin	-		-	-	-	-	-	-	-
26	Plazenta-36 J. Sectio parva Fetus 9,5 cm lang	Carbazol	1		29	25,5	16	8	12	8	1,5
		Harmin	-		-	-	-	-	-	-	-
		Carbazol	4		21,25	20,6	17	11,2	13	13	3,87
		Harmin	1		7	18	14	26	11	19	5

Schwangerschafts Dauer				Gesamt-MPS	Fraktionen absolut						
Nr.	16. SSW	Reaktion	n	µgMPS Uronat / mg TG	1 GP+KS	2 HY	3 HS	4 C-4-S	5 C-6-S	6 DS	7 HE
27	Plazenta-24 J. Interrup.grav. Fetus 11 cm lang	Carbazol	1	3,0	0,76	0,66	0,46	0,15	0,46	0,46	0,05
		Harmin	-	-	-	-	-	-	-	-	-
		Carbazol	1	3,0	0,76	0,66	0,46	0,15	0,46	0,46	0,05
		Harmin	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Schwangerschafts Dauer				Gesamt-MPS	Fraktionen %						
Nr.	16.SSW	Reaktion	n	µgMPS Uronat / mg TG	1 GP+KS	2 HY	3 HS	4 C-4-S	5 C-6-S	6 DS	7 HE
27	Plazenta-24" J. Interrup.grav. Fetus 11 cm lang	Carbazol	1		25,5	22	15,3	5	15,3	15,4	1,5
		Harmin	-		-	-	-	-	-	-	-
		Carbazol	1		25,5	22	15,3	5	15,3	15,4	1,5
		Harmin	-		-	-	-	-	-	-	-

Schwangerschafts Dauer				Gesamt-MPS	Fraktionen absolut						
Nr.	17. SSW	Reaktion	n	µgMPS Uronat / mg TG	1 GP+KS	2 HY	3 HS	4 C-4-S	5 C-6-S	6 DS	7 HE
28	Plazenta-Interrup.grav. Fetus 15 cm lang	Carbazol	1	4,9	0,34	1,23	0,49	0,2	1,23	1,32	0,09
		Harmin	1	4,77	0,14	1,15	0,53	0,72	0,63	1,24	0,33
29	Plazenta-Interrup.grav. Vater-Schizophrenie	Carbazol	1	2,31	0,32	0,42	0,44	0,39	0,30	0,35	0,09
		Harmin	-	-	-	-	-	-	-	-	-
		Carbazol	2	3,60	0,33	1,65	0,46	0,29	0,76	0,83	0,09
		Harmin	1	4,77	0,14	1,15	0,53	0,72	0,63	1,24	0,33

Schwangerschafts Dauer				Gesamt-MPS	Fraktionen %						
Nr.	17. SSW	Reaktion	n	µgMPS Uronat / mg TG	1 GP+KS	2 HY	3 HS	4 C-4-S	5 C-6-S	6 DS	7 HE
28	Plazenta-Interrup.grav. Fetus 15 cm lang	Carbazol	1		7	25	10	4	25	27	2
		Harmin	1		3	24	11	16	13	26	7
29	Plazenta-Interrup.grav. Vater-Schizophrenie	Carbazol	1		14	18	19	17	13	15	4
		Harmin	-		-	-	-	-	-	-	-
		Carbazol	2		10,5	21,5	14,5	10,5	19,0	21,0	3,0
		Harmin	1		3,0	24,0	11,0	16,0	13,0	26,0	7,0

Schwangerschafts Dauer				Gesamt-MPS	Fraktionen absolut						
Nr.	20. SSW	Reaktion	n	µgMPS Uronat / mg TG	1 GP+KS	2 HY	3 HS	4 C-4-S	5 C-6-S	6 DS	7 HE
30	Plazenta-Interrup.grav.	Carbazol	1	3,06	0,58	0,53	0,58	0,37	0,46	0,46	0,09
		Harmin	-	-	-	-	-	-	-	-	-
31	Plazenta-20 J. Interrup.grav. Heroinsüchtig Plazenta sehr schwammig	Carbazol	1	2,78	0,39	0,61	0,47	0,39	0,39	0,45	0,08
		Harmin	1	2,35	0,21	0,49	0,40	0,26	0,35	0,52	0,12
		Carbazol	2	2,92	0,48	0,56	0,52	0,38	0,42	0,45	0,08
		Harmin	1	2,35	0,21	0,49	0,40	0,26	0,35	0,52	0,12

Schwangerschafts Dauer				Gesamt-MPS	Fraktionen %						
Nr.	20. SSW	Reaktion	n	µgMPS Uronat / mg TG	1 GP+KS	2 HY	3 HS	4 C-4-S	5 C-6-S	6 DS	7 HE
30	Plazenta-Interrup.grav.	Carbazol	1		19	17	19	12	15	15	3
		Harmin	-		-	-	-	-	-	-	-
31	Plazenta-20 J. Interrup.grav. Heroinsüchtig Plazenta sehr schwammig	Carbazol	1		14	22	17	14	14	16	3
		Harmin	1		9	21	17	11	15	22	5
		Carbazol	2		16,5	19,5	18	13	14,5	15,5	3
		Harmin	1		9,0	21,0	17	11	15,0	22,0	5

Schwangerschafts Dauer				Gesamt-MPS	Fraktionen absolut						
Nr.	21. SSW	Reaktion	n	µgMPS Uronat / mg TG	1 GP+KS	2 HY	3 HS	4 C-4-S	5 C-6-S	6 DS	7 HE
32	Plazenta-27 J. Sectio parva + TE	Carbazol	1	2,2	0,22	0,37	0,44	0,33	0,24	0,49	0,11
		Harmin	1	2,12	0,19	0,32	0,42	0,30	0,21	0,55	0,13
		Carbazol	1	2,20	0,22	0,37	0,44	0,33	0,24	0,49	0,11
		Harmin	1	2,12	0,19	0,32	0,42	0,30	0,21	0,55	0,13

Schwangerschafts Dauer				Gesamt-MPS	Fraktionen %						
Nr.	21. SSW	Reaktion	n	µgMPS Uronat / mg TG	1 GP+KS	2 HY	3 HS	4 C-4-S	5 C-6-S	6 DS	7 HE
32	Plazenta- 27 J. Sectio parva + TE	Carbazol	1		10	17	20	15	11	22	5
		Harmin	1		9	15	20	14	10	26	6
		Carbazol	1		10	17	20	15	11	22	5
		Harmin	1		9	15	20	14	10	26	6

Schwangerschafts Dauer				Gesamt-MPS	Fraktionen absolut						
Nr.	22. SSW	Reaktion	n	µgMPS Uronat / mg TG	1 GP+KS	2 HY	3 HS	4 C-4-S	5 C-6-S	6 DS	7 HE
33	Plazenta- 32 J. Abortus spontaneus Fetus 17 cm lang	Carbazol	1	1,20	0,22	0,13	0,21	0,11	0,22	0,26	0,05
		Harmin	-	-	-	-	-	-	-	-	-
34	Plazenta- Interrup.grav.	Carbazol	1	1,88	0,28	0,34	0,38	0,28	0,17	0,38	0,05
		Harmin	1	1,71	0,15	0,29	0,36	0,21	0,17	0,41	0,12
		Carbazol	2	1,54	0,25	0,23	0,29	0,19	0,19	0,32	0,05
		Harmin	1	1,71	0,15	0,29	0,36	0,21	0,17	0,41	0,12

Schwangerschafts Dauer				Gesamt-MPS	Fraktionen %						
Nr.	22. SSW	Reaktion	n	$\frac{\mu g MPS_{Uronat}}{mg\ TG}$	1 GP+KS	2 HY	3 HS	4 C-4-S	5 C-6-S	6 DS	7 HE
33	Plazenta -32 J. Abortus spontaneus Fetus 17 cm lang	Carbazol	1		18	11	18	9	18	22	4
		Harmin	-		-	-	-	-	-	-	-
34	Plazenta-Interrup.grav.	Carbazol	1		15	18	20	15	9	20	3
		Harmin	1		9	17	21	12	10	24	7
		Carbazol	2		16,5	14,5	19	12	13,5	21	3,5
		Harmin	1		9	17	21	12	10	24	7

Schwangerschafts Dauer				Gesamt-MPS	Fraktionen absolut						
Nr.	26. SSW	Reaktion	n	µgMPS Uronat / mg TG	1 GP+KS	2 HY	3 HS	4 C-4-S	5 C-6-S	6 DS	7 HE
35	Plazenta- 27 J. Berechnung: 33.SSW Sonographie : 26.SSW Plazënta-rosa, schwammig, Nabelschnur rot, Kind weiblich tot geboren 1100 gr, 39 cm lang	Carbazol	1	2,16	0,28	0,39	0,37	0,48	0,19	0,41	0,04
		Harmin	1	1,40	0,13	0,28	0,24	0,18	0,15	0,36	0,06
		Carbazol	1	2,16	0,28	0,39	0,37	0,48	0,19	0,41	0,04
		Harmin	1	1,40	0,13	0,28	0,24	0,18	0,15	0,36	0,06

Schwangerschafts Dauer				Gesamt-MPS	Fraktionen %						
Nr.	26. SSW	Reaktion	n	µgMPS Uronat / mg TG	1 GP+KS	2 HY	3 HS	4 C-4-S	5 C-6-S	6 DS	7 HE
35	Plazenta- 27 J. Berechnung : 33. SSW Sonographie : 26. SSW Plazenta rosa, schwammig, Nabelschnur rot, Kind weiblich, tot geboren 1100 gr, 39 cm lang	Carbazol	1		13	18	17	22	9	19	2
		Harmin	1		9	20	17	13	11	26	4
		Carbazol	1		13	18	17	22	9	19	2
		Harmin	1		9	20	17	13	11	26	4

Schwangerschafts Dauer				Gesamt-MPS	Fraktionen absolut						
Nr.	Neugeborenes	Reaktion	n	µgMPS Uronat / mg TG	1 GP+KS	2 HY	3 HS	4 C-4-S	5 C-6-S	6 DS	7 HE
36	Plazentazotten, Neugeborenes gesund	Carbazol	1	1,61	0,12	0,32	0,31	0,24	0,16	0,35	0,11
		Harmin	1	1,43	0,09	0,33	0,26	0,21	0,13	0,33	0,08
37	Plazentazotten Neugeborenes gesund	Carbazol	1	1,47	0,18	0,29	0,27	0,19	0,10	0,27	0,17
		Harmin	1	1,31	0,10	0,31	0,28	0,18	0,09	0,28	0,07
		Carbazol	2	1,54	0,15	0,30	0,29	0,21	0,13	0,31	0,14
		Harmin	2	1,37	0,09	0,32	0,27	0,19	0,11	0,30	0,07

Schwangerschafts Dauer				Gesamt-MPS	Fraktionen %						
Nr.	Neugeborenes	Reaktion	n	µg MPS Uronat / mg TG	1 GP+KS	2 HY	3 HS	4 C-4-S	5 C-6-S	6 DS	7 HE
36	Plazentazotten	Carbazol	1		7	20	19	15	10	22	7
	Neugeborenes gesund	Harmin	1		6	23	18	15	9	23	6
37	Plazentazotten	Carbazol	1		12	20	18	13	7	18	12
	Neugeborenes gesund	Harmin	1		8	24	21	14	7	21	5
		Carbazol	2		14,5	20	18,5	14	8,5	20	9,5
		Harmin	2		7,0	23,5	19,5	14,5	8,0	22	5,5

Schwangerschafts Dauer				Gesamt-MPS	Fraktionen absolut						
Nr.	Neugeborenes	Reaktion	n	µgMPS Uronat / mg TG	1 GP+KS	2 HY	3 HS	4 C-4-S	5 C-6-S	6 DS	7 HE
38	Plazentazotten	Carbazol	1	1,12	0,17	0,22	0,21	0,15	0,12	0,22	0,03
	Mutter mit Glukosurie	Harmin	1	1,07	0,11	0,20	0,19	0,16	0,08	0,27	0,06
		Carbazol	1	1,12	0,17	0,22	0,21	0,15	0,12	0,22	0,03
		Harmin	1	1,07	0,11	0,20	0,19	0,16	0,08	0,27	0,06

Schwangerschafts Dauer				Gesamt-MPS	Fraktionen %						
Nr.	Neugeborenes	Reaktion	n	$\frac{\mu g\ MPS_{Uronat}}{mg\ TG}$	1 GP+KS	2 HY	3 HS	4 C-4-S	5 C-6-S	6 DS	7 HE
38	Plazentazotten	Carbazol	1		15	20	19	13	10	20	3
	Mutter mit Glukosurie	Harmin	1		10	19	17,5	14,5	8	25	6
		Carbazol	1		15	20	19	13	10	20	3
		Harmin	1		10	19	17,5	14,5	8	25	6

Schwangerschafts Dauer				Gesamt-MPS	Fraktionen absolut						
Nr.	Neugeborenes Mutter Diabetes mellitus	Reaktion	n	µgMPS Uronat / mg TG	1 GP+KS	2 HY	3 HS	4 C-4-S	5 C-6-S	6 DS	7 HE
39	Plazentazotten - fest	Carbazol	1	2,0	0,22	0,50	0,36	0,18	0,2	0,44	0,08
	27 J. juveniler Diab.mellitus Errechn. Termin 13.2.1978 25.1.-BZ 236mg% 26.1.-12.00 -BZ 390 mg% 16.00 nach Geb. -BZ 346 mg% 3130 gr Totgeburt	Harmin	1	1,91	0,10	0,53	0,29	0,19	0,19	0,53	0,08
40	Plazentazotten normal,	Carbazol	1	2,93	0,59	0,35	0,75	0,32	0,41	0,47	0,06
	24. J. juv. Diabetes mellit, -BZ kleiner 120 mg%, I.Kind 2420 gr, 44 cm lang	Harmin	1	2,12	0,23	0,32	0,43	0,30	0,23	0,47	0,10

Schwangerschafts Dauer				Gesamt-MPS	Fraktionen absolut						
Nr.	Neugeborenes Mutter Diabetes mellitus	Reaktion	n	µgMPS Uronat / mg TG	1 GP+KS	2 HY	3 HS	4 C-4-S	5 C-6-S	6 DS	7 HE
41	Plazentazoten sehr blutig mit 15 J. juvenil. Diabetes mellitus I.Kind, 37.SSW Totgeburt II.Kind, weibl. 2600 gr. lebt 45 cm lang Bei Geburt -BZ 234 mg%	Carbazol	1	1,66	0,25	0,33	0,37	0,17	0,20	0,26	0,08
		Harmin	1	1,41	0,10	0,27	0,27	0,18	0,18	0,31	0,10
		Carbazol	3	2,18	0,35	0,39	0,49	0,22	0,27	0,39	0,09
		Harmin	3	1,61	0,14	0,37	0,33	0,22	0,20	0,44	0,09

Schwangerschafts Dauer				Gesamt-MPS	Fraktionen %						
Nr.	Neugeborenes Mutter Diabetes mellitus	Reaktion	n	µgMPS Uronat / mg TG	1 GP+KS	2 HY	3 HS	4 C-4-S	5 C-6-S	6 DS	7 HE
39	Plazentazotten - fest	Carbazol	1		11	25	18	9	11	22	4
	27 J. juveniler Diab.mellitus Errechn.Termin 13.2.1978 25.1.-BZ 236 mg% 26.1.-12.00 -BZ 390 mg% 16.00 nach Geb. - BZ 346 mg% 3130 gr Totgeburt	Harmin	1		5	28	15	10	10	28	4
40	Plazentazotten normal	Carbazol	1		20	12	25	11	14	16	2
	24 J. juv. Diabetes mell. -BZ kleiner 120 mg%, I.Kind 2420 gr.,44 cm lang	Harmin	1		11	15	22	14	11	22	5

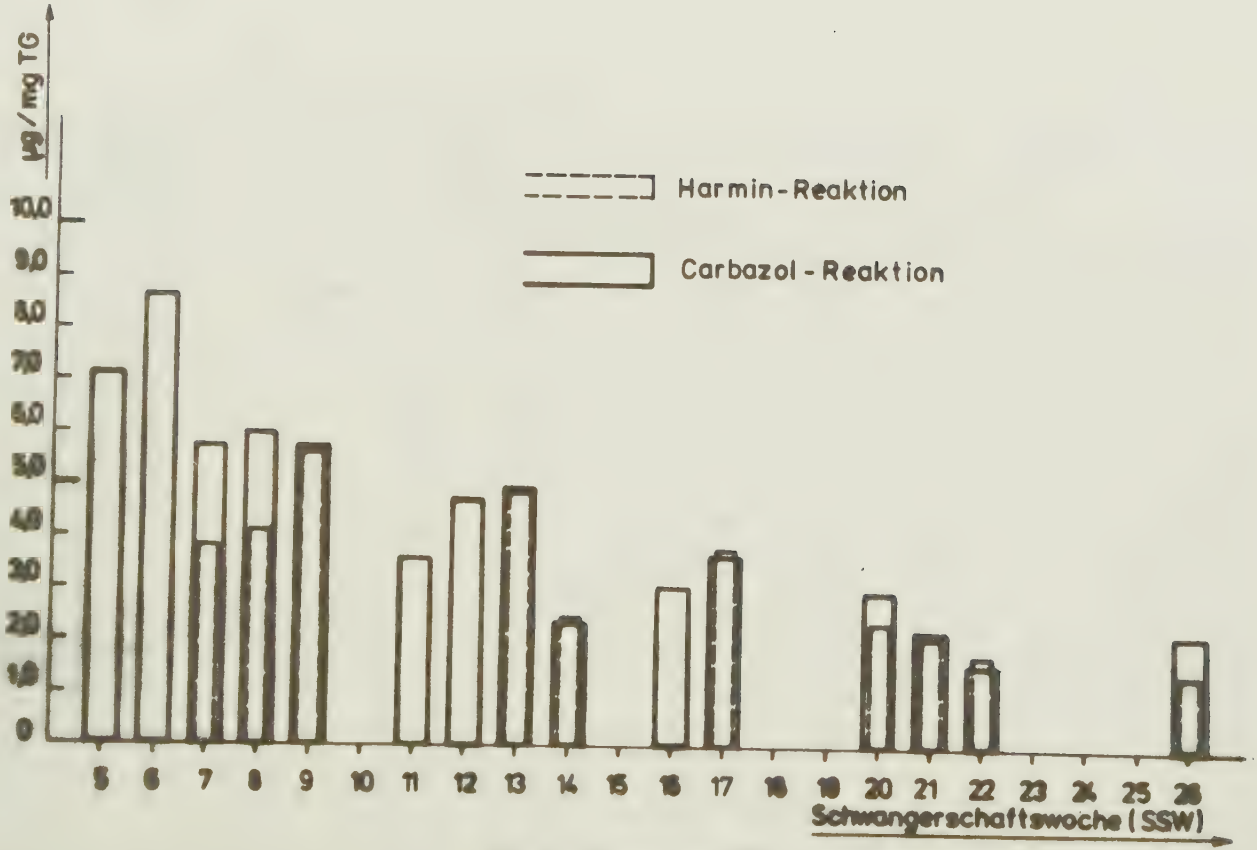
Schwangerschafts Dauer				Gesamt-MPS	Fraktionen %						
Nr.	Neugeborenes Mutter Diabetes mellitus	Reaktion	n	µgMPS Uronat / mg TG	1 GP+KS	2 HY	3 HS	4 C-4-S	5 C-6-S	6 DS	7 HE
41	Plazentazoten	Carbazol	1		15	20	22	10	12	16	5
	sehr blutig mit 15 J. juvenil. Diabetes mellitus I.Kind, 37 SSW Totgeburt II.Kind. weibl. 2600 gr. lebt 45 cm lang Bei Geburt -BZ 234 mg%	Harmin	1		7	19	19	13	13	22	7
		Carbazol	3		15,3	19,0	21,6	10,0	12,3	18,0	3,7
		Harmin	3		7,7	20,7	18,6	12,3	11,3	24,0	5,3

Schwangerschafts Dauer				Gesamt-MPS	Fraktionen absolut						
Nr.	Neugeborenes	Reaktion	n	µgMPS Uronat / mg TG	1 GP+KS	2 HY	3 HS	4 C-4-S	5 C-6-S	6 DS	7 HE
36 37	bei gesunden Müttern	Carbazol	2	1,54	0,15	0,30	0,29	0,21	0,13	0,31	0,14
39 40 41	bei Müttern mit Diabetes mellitus	Carbazol	3	2,18	0,35	0,39	0,49	0,22	0,27	0,39	0,09
36 37	bei gesunden Müttern	Harmin	2	1,37	0,09	0,32	0,27	0,19	0,11	0,30	0,07
39 40 41	bei Müttern mit Diabetes mellitus	Harmin	3	1,61	0,14	0,37	0,33	0,22	0,20	0,44	0,09

Schwangerschafts Dauer				Gesamt-MPS	Fraktionen absolut						
Nr.	Normale Plazenten	Reaktion	n	µgMPS Uronat / mg TG	1 GP+KS	2 HY	3 HS	4 C-4-S	5 C-6-S	6 DS	7 HE
	5. SSW	Carbazol	1	7,1	2,77	1,06	0,57	0,07	0,07	1,92	0,14
	6. SSW	"	2	8,6	2,30	2,45	1,25	0,60	1,10	0,50	0,30
	7. SSW	"	3	5,7	1,85	0,79	0,82	0,35	0,88	0,79	0,24
	8. SSW	"	3	5,95	1,99	0,74	0,63	0,50	0,84	0,95	0,28
	9. SSW	"	3	5,70	1,29	0,70	0,79	0,61	0,99	1,32	0,20
	11. SSW	"	2	3,55	0,67	0,48	0,45	0,07	1,12	0,50	0,20
	12. SSW	"	4	4,72	1,07	0,80	0,55	0,24	0,76	1,07	0,22
	13. SSW	"	4	4,93	0,91	0,85	0,80	0,37	0,77	0,92	0,19
	14. SSW	"	4	2,37	0,49	0,49	0,40	0,27	0,30	0,30	0,09
	16. SSW	"	1	3,00	0,76	0,66	0,46	0,15	0,46	0,46	0,05
	17. SSW	"	2	3,60	0,33	1,65	0,46	0,29	0,76	0,83	0,09
	20. SSW	"	2	2,92	0,48	0,56	0,52	0,38	0,42	0,45	0,08
	21. SSW	"	1	2,20	0,22	0,37	0,44	0,33	0,24	0,49	0,11
	22. SSW	"	2	1,54	0,25	0,23	0,29	0,19	0,19	0,32	0,05
	26.-totgeboren	"	1	2,16	0,28	0,39	0,37	0,48	0,19	0,41	0,04
	Neugeborenes	"	2	1,54	0,15	0,30	0,29	0,21	0,13	0,31	0,14

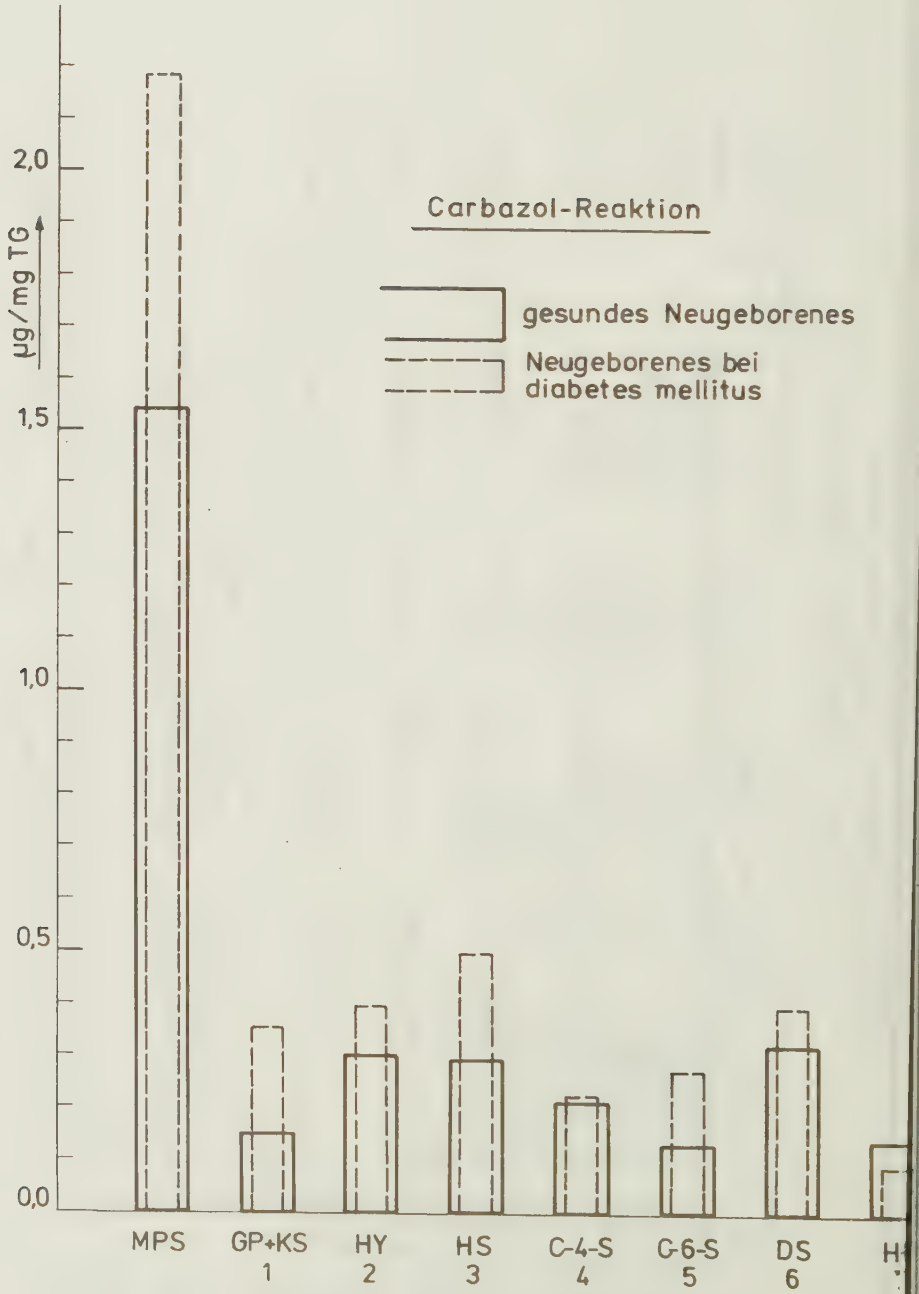
Schwangerschafts Dauer				Gesamt-MPS	Fraktionen absolut						
Nr.	Normale Plazenten	Reaktion	n	µgMPS Uronat / mg TG	1 GP+KS	2 HY	3 HS	4 C-4-S	5 C-6-S	6 DS	7 HE
	7. SSW	Harmin	2	3,80	0,72	0,37	0,52	0,32	0,36	1,09	0,35
	8. SSW	"	3	4,10	2,30	0,53	0,51	0,42	0,44	1,24	0,41
	9. SSW	"	2	5,55	0,45	0,71	0,71	0,54	0,62	1,98	0,54
	13. SSW	"	2	4,91	0,32	0,78	0,74	0,46	0,60	1,61	0,38
	14. SSW	"	1	2,48	0,17	0,45	0,35	0,65	0,27	0,47	0,12
	17. SSW	"	1	4,77	0,14	1,15	0,53	0,72	0,63	1,24	0,33
	20. SSW	"	1	2,35	0,21	0,49	0,40	0,26	0,35	0,52	0,12
	21. SSW	"	1	2,12	0,19	0,32	0,42	0,30	0,21	0,55	0,13
	22. SSW	"	1	1,71	0,15	0,29	0,36	0,21	0,17	0,41	0,12
	26. SSW	"	1	1,40	0,13	0,28	0,24	0,18	0,15	0,36	0,06
	Neugeborenes	"	2	1,37	0,09	0,32	0,27	0,19	0,11	0,30	0,07

G R A P H I S C H E D A R S T E L L U N G D E R A R B E I T S E R G E B N I S S E

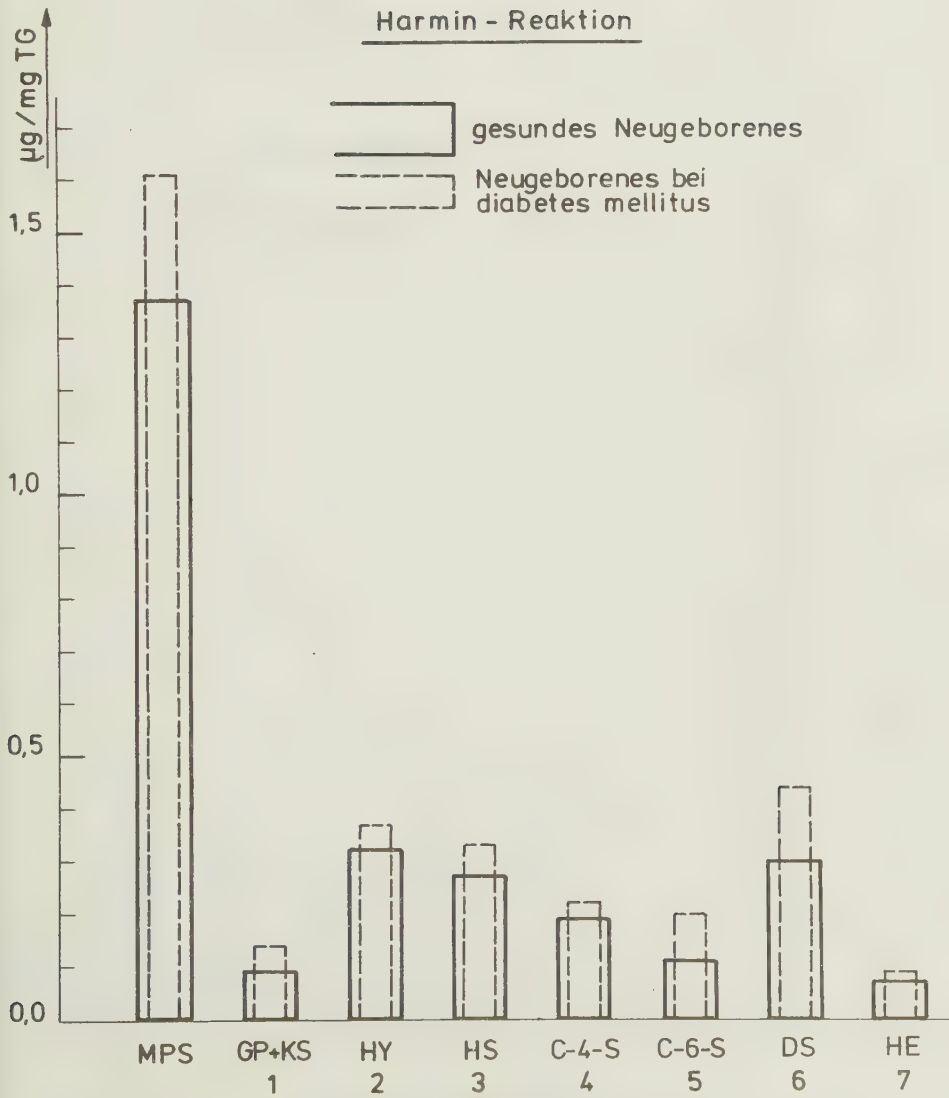


Tab. 1 Gesamt-MPS (µg/mg TG)

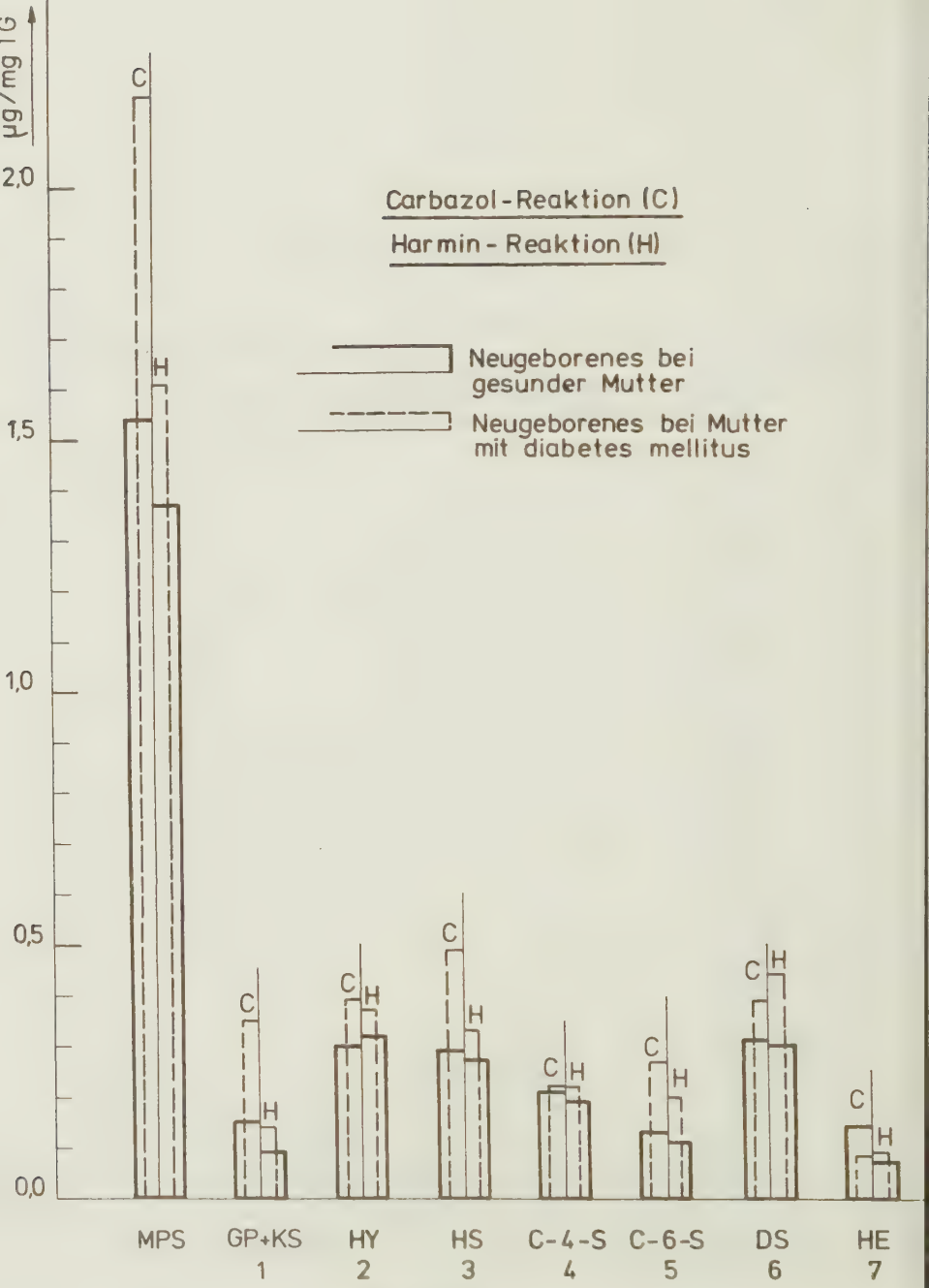
Tab. 2 Fraktionierung d. MPS (µg/mg TG)



Tab. 3 Gesamt-MPS und Fraktionierung d.MPS (µg/mg TG)



Tab. 4 Gesamt-MPS und Fraktionierung d. MPS (µg / mg TG)



Tab. 5 Gesamt-MPS und Fraktionierung d. MPS (µg/mg TG)

D I S K U S S I O N

Seit ungefähr 20 Jahren stehen in der Biochemie und etwas später auch in der Humangenetik die Verbindungen - Zucker - Eiweiß im Mittelpunkt des Interesse. Durch intensive Erforschung der Mucopolysaccharide und der Glykoproteine sind vielfältige biochemische und biologische Eigenschaften wissenschaftlich untersucht und beschrieben worden.

Bei verschiedenen Lebewesen ist der MPS-Gehalt und ihre Zusammensetzung in den Plazenten unterschiedlich. So z.B. hat man sehr MPS-reiche Plazenten bei Schweinen (39) - nämlich 8x größerer Betrag (in II. Hälfte der Schwangerschft) als bei gesunden humanen Plazenten gefunden (41). Bei Mäusen (gesund) ist der MPS-Gehalt in ihren Plazenten 2x höher als bei gesunden humanen Plazenten (40). Bei diabetischen Plazenten von Ratten (37) ist der MPS-Gehalt 2-3x höher (Spongiosa-Gesamt-MPS/ Labyrinth-Gesamt-MPS) als bei Plazenten von gesunden Ratten.

Nach (21) führt die Reduktion der utero-plazentalen Blutversorgung zur Hypoxie (44), (45), welche gewöhnlich von einem Zuwachs der Gesamt-MPS-Synthese begleitet wird (43). Die MPS-Ausscheidung im Urin von diabetischen Müttern ist in (46) schon beschrieben worden.

Die MPS haben eine funktionelle Bedeutung mit Hinsicht auf ihren möglichen Einfluß auf den plazentalen Austausch.

Aus (42) sind die verschiedene Änderungen in dem totalen Inhalt und Verhältnis der MPS untereinander auf die Reifung der Plazenta ersichtlich.

Zwischen den diabetischen und gesunden Plazenten sollte der Unter-

schied eher quantitativ als qualitativ sein (44), (47).

Nach (37) gilt die direkte Korrelation zwischen Gesamt-MPS-Inhalt in Rattenplazenten und dem Grad der mütterlichen Hyperglykämie. Die erhöhte Gesamt-MPS-Synthese in diesen Plazenten kann eine gehemmte (retardierende) biochemische Differenzierung reflektieren.

Vom Betrachten der Tabelle 1 - ist eindruckvoll zu sehen, wie die Gesamt-MPS der normalen Plazenten in dem 1. Trimenom signifikant abnehmen, danach sinken sie allmählich bis zu dem Schwangerschaftsendwert.

Die Tabelle 2 bringt die Diskrepanz zwischen den verschiedenen Fraktionen im Verlauf der Schwangerschaft zum Ausdruck. Die Glykoproteine A-AS stellen die größte Fraktion als Menge dar. Im 1. Trimenom sinken sie schneller, und dann nähern sie sich dem Schwangerschaftsendwert langsam zu.

In der 3. Schwangerschaftswoche ist die PY- und Gesamt-MPS-Menge am größten. Die PY sollte nach (41) das Terratabilitäts-Phänomen ausmachen, jedoch auch ein Zusammenspiel mit der Gesamt-MPS nicht ausgeschlossen ist. Im Gegensatz zu (42) ist bei der vorliegenden Arbeit die Heparinanwesenheit nachgewiesen worden. Es wurde in allen Plazenten die Anwesenheit von Heparin festgestellt.

In 38 [illegible] Plazenten (in verschiedenen Schwangerschaftswochen) mit größeren Mengen als C-4-S present.

Aus den Tabellen 1 und 4 ist der höhere Gesamt MPS-Gehalt bei geburtsreifen Plazenten aus einer diabetischen Schwangerschaft im Vergleich zu Kontrollen evident.

Die Tabelle 3 zeigt eindeutig, daß nicht nur die Gesamt-MPS (bei beiden analytischen Ketten), sondern auch alle Fraktionen 1-7 bei Neu-

geborenenplazenten von diabetischen Müttern im Vergleich zu Plazenten aus gesunden Schwangerschaften erhöht sind.

Bei diabetischen Schwangerschaften sind Gesamt-MPS nicht nur in humanen Plazenten, sondern auch in Plazenten von Ratten, mit durch Streptozotocin (37) induzierten Diab. mellitus erhöht.

In humanen diabetischen Plazenten ist neben erhöhten Gesamt-MPS-Gehalt (Tabelle 5) auch erhöhter Glykogen-Gehalt durch (33), (34), (35) und (36) nachgewiesen.

Der Insulinmangel bei Diab. mellitus verursacht, daß die Glukose auf insulinunabhängigem Wege eigeschleust wird. Dadurch wird die Synthese von Glykogen, Glykoproteine und MPS gesteigert. Intensivierung des Glykoproteinstoffwechsels führt zu einer Zunahme der Glykoproteinkonzentration in der Basalmembrane (sie wird verdickt) (16).

Die Membranoberfläche der Mikrovilli von placent. Syncytiotrophoblast repräsentiert den innersten Kontakt des Fetus und des mütterlichen vaskulären Kreislaufs. Nach (48) soll diese syncytiotrophoblastische Membrane eine Barriereschicht darstellen - die immunologische Plazentaschranke.

Weil in der Plazenta die MPS und Glykoproteine präsent sind, könnten sie gemeinsam an der Bildung dieser Plazentarschranke beteiligt sein. Ohne jegliche immunologische Plazentarschranke würde demnach das matermale Gewebe diese fremde fetale und plazentale Gewebe erkennen und abstoßen.

Die Gesamt-MPS und Glykoproteine nehmen mit Alter der Schwangerschaft ab (Tabelle 1, Tabelle 2); dies kann für den Abbau der Plazentarschranke sprechen.

Mit Abnahme (Lockerung) der Plazentarschranke können wahrscheinlich

die mütterliche Antikörper mit Hilfe der Transportmechanismen (diese sind notwendig, weil die Immunglobine ein zu großes Molekulargewicht haben) gegen Ende der Schwangerschaft diese Barriere passieren. Denkbar ist auch die Möglichkeit, durch erhöhte Aktivität der plazentalen Enzyme die Effektivität der Plazentarschranke zu steigern. Bei Steigerung der z.B. Uridinphosphatglukose - Dehydrogenase - Aktivität wird UDP - Glucuronsäure vermehrt synthetisiert. Dann kann die UDP Glucuronsäure als Baustein der sauren MPS dienen, oder in dem intermediären Stoffwechsel der Entgiftung durch Glucuronidierung auf diese Weise benutzt werden (49). Auf diese Weise können dann die MPS und Glykoproteine gemeinsam die Plazentarschranke regeln.
Dadurch, daß bei Diab. mellitus der Spiegel der Gesamt-MPS und Glykoproteine im Verlauf der Schwangerschaft erhöht ist, kann das Folgen für die Passierbarkeit der Plazentarschranke haben. Villeicht werden dann gegen Ende der Schwangerschaft die Immunoglobuline auf Grund der erhöhten Präsenz dieser Substanzen in geringerem Maße in den fetalen Kreislauf mit Hilfe der Transportmechanismen eingeschleußt. Bei Patienten mit Diabetes mellitus sind oft geschwächte Abwehrkräfte vorhanden.

S C H L U S S W O R T

In der vorliegenden Arbeit wurden Plazenten von gesunden Müttern im Verlauf der Schwangerschaft, von Neugeborenen mit gesunden Müttern und Neugeborene mit diabetischen Müttern untersucht. Mit geeigneten biochemischen Methoden wurde ihr Gehalt an sauren MPS, sowie das MPS-Fraktionierungsmuster bestimmt.
Das gesammelte Zahlenmaterial habe ich tabellarisch geordnet und in übersichtlichen Diagrammen aufgezeichnet.
Bei gesunden Plazenten ist eindruckvoll zu sehen, wie die Gesamt-MPS in dem I. Trimenom signifikant abnehmen. Aus den Fraktionen sinken die Glykoproteine + KS im I. Trimenom ähnlich so schnell, wie die Gesamt-MPS; sie stellen die größte Fraktion als Menge dar.

Die Resultate zeigten auffallende Unterschiede zwischen gesunden und diabetischen Plazenten. Bei diabetischen Plazenten sind nicht nur die Gesamt-MPS, sondern auch alle anderen Fraktionen erhöht.

Durch quantitative und qualitative Bestimmung der Gesamt-MPS in den Plazenten ist der Nachweis erbracht worden, daß sie im plazentalen Gewebe vorhanden sind. Deshalb könnten sie gemeinsam an der Bildung einer Plazentarschranke beteiligt sein.

Durch den Insulinmangel bei Diabetes mellitus wird die Synthese von höheren Polymeren - wie MPS und Glykoproteine gesteigert. Das bedeutet, daß durch die Zunahme der Glykoproteinkonzentration in den Basalmembranen die Effektivität der Plazentarschranke steigt, welche zur Behinderung des nötigen Stoffwechselaustausches (auch mütterlichen Antikörper) führen kann.

L I T E R A T U R V E R Z E I C H N I S

(1) Rapoport, S.M.
Medizinische Biochemie, 5.Auflage, Berlin 1969

(2) Buddecke, E.
Grundriß der Biochemie, 5.Auflage, Walter de Gruyter, Berlin-New York 1977

(3) Buddecke, M., Schubert, M.
Isolierung und chemische Zusammensetzung eines Chondroitinsulfatproteins aus der Aorta des Menschen, Hoppe-Seyler's Zeitschrift für physiol. Chemie, Bd. 325, 189-203, 1961

(4) Karlson, P.
Biochemie, 10. Auflage, georg Thieme Verlag, Stuttgart 1977

(5) Asboe-Hansen, G.
The Origin of synovial mucin, Ehrlich's mast cell -a secretory element of connective fissue, Ann. Rheumat.Dis.,London 9,149,1950

(6) Richter, M.
Untersuchungen über MPS in Geweben menschlichen Embryos und Feten im Verlauf der Ontogenese, Inaugural-Dissertation, Ffm 1972

(7) Švejcar, J.
Die Variabilität d. Verteilungsmuster d. MPS während d. Ontogenese in normalen und pathol adulten Gewebe, Habilitationsschrift Ffm 1969

(8) Salmon, W.D., du Vall, M.R., Thompson, E.Y.
Stimulation by insulin in vitro of incorporation of (^{35}S)sulfate and (^{14}C)leucine into protein polysacchride complexes, (^{3}H)uridine into RNA, and (^{3}H) thymidine into DNA of costal cartilage from

hypophysectomized rats, Endocrinology 82:493 1968

(9) Böhme, C.D.
Biochemische Untersuchungen über den Mucopolysaccharidinhalt von orthopädisch-operativ entnommenen Bindegewebsproben, Inaugural-Dissertation, Ffm 1971

(10) Enzelsberger, W.
Mucopolysaccharide im ligamentum flavum und ligamentum interspinale von Skoliose-Patienten, Inaugural-Dissertation, Ffm 1980

(11) Bitter, T., Muir, H.
Anal.Biochem., 4, 330 1962
zit. nach (15)

(12) Antonopoulos, C.A., Gardell, S., Szirmai, J.A., de Tyssonsk, E.R.
Biochem. Biophys. Acta, 83, 1 1964
zit. nach (15)

(13) Humbel
Quantitative determination of Glycosaminoglycan-Uronic acid.
Luxemburg 1979

(14) Blumenkrantz,N., Asboe-Hansen, G.
New metod for quantitative determination of uronic acid anal.
Biochem. 54, 484-489 1973

(15) Švejcar, J., Robertson, W.B.
Micro separation and determination of mamalian Acidic Glycosaminoglycans (Mucopolysaccharides), Analytical Biochemistry,18, 333 - 350, 1967

(16) Bachmann, K.D.
Diab. mellitus im Kindes -und Jugendalter, Georg Thieme Verlag

Stuttgart, New York 1980

(17) Pedersen, J.
The pregnant diabetic and her newborn. 2.Aufl Williams & Wilkins, Baltimore 1977

(18) Bennett, P.H., Webner, C. & Miller, M. 1979
Congenital anomalies and the diabetic and prediabetic pragnancy. In pregnancy metabolism Diabetes and the Fetus. CIBA Fundation Symposium 63. pp 207-218 Amsterdam: Excerpta Medica

(19) Vogel, M.
Plakopathia diabetica, Entwicklungsstörungen der Plazenta bei Diabetes mellitus der Mutter. Virchows Arch. path.Anat. 343, 51-63 1967

(20) Kloos,K., Vogel, M.
Plazentationsstörungen, Virchows Arch. path. Anat. 343,245-257, (

(21) Benirschke, K. Driscolll, S.G.
The pathology of the human placenta, Springer-Verlag Berlin-New York-Heidelberg 1967

(22) Emrich, P., Gödel, E.
Morphologie der Placenta bei mütterlichen Diabetes, Zbl.Gynaek.9[illegible] 1972 881.887

(23) Clavero-Nunez, J.A., Botella-Llusia, J.
Ergebnisse von Messungen d. Gesamtoberfläche normalen und krankhaften Placenten, Arch. Gynaek. 198 1963, 56-60

(24) Becker, V.
Funktionelle Morphologie der Placenta, Arch.Gynaek.198,3 1963

(25) Düring, W., Kloos, K.

Morphologische Routinediagnostik der Placenta.Münch.med.Wschr.106, 1849 (1964)

(26) Ehrhardt,G.,Gerl,D.,Wasmund,B.
Morphometrische Untersuchungen der Frühgeborenenplacenta unter besonderer Berüchsichtigung d.Mikrofibrinoidablagerungen,Zbl.Gynaek.94 (1972),1110-1115

(27) Widmaier,G.
Zu Ultrastruktur menschlicher Plazentazotten beim Diab.mell.Archiv Gynaek.208,396-409 (1970)

(28) Kade,H.,Dietel,H.
Schwangerschaft bei prädiab.und diabetischen Frauen.Dtsch.med. Wschr.77,673 (1952)

(29) Katsch,G.
Diabetes und Schwangerschaft,Mün.med.Wschr.99,1108 (1957)

(30) Pedersen,J.
Foetal mortality in diabetes in relation to management.Acta endocr.(Kbh.) 15,282 (1959)

(31) Rust,T.
Diabetes und Schwangerschaft.Geburtshilfliche Aspekte.Gynaecologia (Basel) 159,215 (1965)

(32) Worm,M.
Diabet.mell. und Schwangerschaft.Berlin.Akademie-Verlag 1959

(33) Okudaira,Y.,Hirota,K.,Cohen,S.,Strauß,L.
Ultrastrukture of the human placenta in maternal diabetic mellitus. Lab.Invest. 15,910 (1966)

(34) Heijkenskjöld,F.,Gemzell,C.A.
Glykogen content in the placenta of diabetic mothers.Acta Praediat (Uppsala) 46,74 (1957)

(35) Lister,U.
The ultrastructure of the placenta in abnormal pregnancy.I.Obstet. Gynaec.Brit.Cwth. 72,203 (1965)

(36) Hirota,K.,Strauß,L.
Elektron microscopic observations on the human placenta in diabetes.Fed.Proc.(Abstracts) 23,575 (1964)

(37) Abramovici,A.,Švejcar,J.
Histochemical and Quantitative Biochemical Changes in Mucopolysaccharides of the Term Placenta of the Diabetic Rat. Placenta (1982), 3,81-93

(38) Abramovici,A.,Sporn,J.,Prager,R.,Shaltiel,A.,Laron,Z. & Liban,E.
Glykogen metabolism in the placenta of Streptozotocin diabetic rats. Hormone and metabolic Research,10,177-262, (1978)

(39) Steele,V.,S.,Froseth,J.,A.
Effect of gestational age on the biochemical composition of porcine placental Glycosaminoglycans (41008),Society for Experimental Biology and medicine 165,480-485 (1980)

(40) Švejcar,J.
The content of glycosaminoglycans(Mucopolysaccharides) in mouse fetus and placenta.Biochem.Biophys.Acta 165,84 (1968)

(41) Lee,T.,Y.,Jamieson,A. M.,Schafer,I.A.
Changes in the composition and strukture of glycosaminoglycans in the human placenta during development,Pediatr.Res.7:965, (1973)

(42) Wasserman,L.,Shlesinger,H.,Abramovici,A.,Goldman,J.A.,and Allalouf,D. Changes in glycosaminoglycan composition of normal human placentas with maturation, Am. J.Obstet.Gynecol.138:763, 1980

(43) Wasserman,L.,Shlesinger,H.,Abramovici,A.,Goldman,J.A.,and Allalouf,D. Glycosaminoglycan patterus in diabetic and toxemic term placentas Am. J.Obstet.Gynecol.138:769, 1980

(44) Jones,C.J.P.,and Fox,H.
An ultrastructural and ultrahistochemical study of the placenta of the diabetic woman,J.Pathol. 119:91,1976

(45) Fox,H.
Effect of hypoxia on trophoblast in organ culture,AM.J.Obset. Gynecol. 107:1058,1970

(46) Von Anton,W.,Schmidt,D.,Schmeiser,G.
Zur Frage der Ödembildung bei Spätgestose unter besonderer Berücksichtigung der sauren MPS. Zentralbl. Gynaekol. 92:1334,1970

(47) Anderson,W.R.,and Mc Kay,D.G.
Elecro microskopic study of the trophoblast in normal and toxemic placentas, AM.J.Obstet. Gynecol. 95:1134,1966

(48) K.Okamura,J.E.Powell,A.c.Lee & V.C.Stevens
Charakterization of Solubilized Mikrovillous Membrane Proteins and Glycoproteins from Human Placental Syncytiotrophoblast,Placenta (1981) 2,117-128

(49) E.Kratsch und J.-H.Grygiel
Über das Vorkommmen eines spezifischen Enzyms der Glucuronsäurebildung im menschlichen Amnion ,Z.Zellforsch.123,566-571,Springer Verlag 1972

C U R R I C U L U M V I T A E

Persönliche Daten :

geboren	07.02.1943
in	Tabor (CS)
Eltern	Dipl.-Ing. Josef Picek Frau Vlasta, geb. Gabriel
Familienstand	verheiratet
Ehemann	Dipl.-Ing. Josef Robotka
Kinder	Gabriela (1964), Josef (1969)
Staatsangehörigkeit	deutsch

Ausbildungsdaten :

1949 - 1952	Volksschule in Tabor
1952 - 1960	Gymnasium in Tabor
I. Hochschulstudium 1960 - 1965	Technische Hochschule in Prag (Abschluß als Dipl.-Ing. Maschinenbau)
1966 - 1969	Fachlektor im Staatlichen technischen Verlag in Prag
ab 11.10.1969	wohnhaft in Frankfurt am Main
1971 - 1972	Angestellt bei der Fa. A.Teves in Frankfurt am Main im Rechenzentrum
II. Hochschulstudium 1972 - 1982	Johann Wolfgang Goethe-Universität Frankfurt am Main Humanmedizin
08.09.1980	zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
06.04.1982	Ärztliche Prüfung
12.05.1982	Approbation als Arzt
01.10.1982	Assistenzarzt in der chirurgischen Abteilung des Kreiskrankenhauses in Hofheim/Taunus

Frankfurt am Main, März 1983

Gabriel Robotka

Ehrenwörtliche Erklärung

Ich erkläre ehrenwörtlich, daß ich die dem Fachbereich Humanmedizin der Johann Wolfgang Goethe-Universität in Frankfurt am Main zur Promotionsprüfung eingereichte Arbeit mit dem Titel :

BIOCHEMISCHE
VERÄNDERUNGEN DER MUCOPOLYSACCHARIDE
IN GESUNDEN UND DIABETISCHEN
HUMANEN PLAZENTEN
WÄHREND DER ONTOGENESE

im Institut für Humangenetik der Johann Wolfgang Goethe-Universität Frankfurt am Main unter der Leitung von

Herrn Prof.Dr.med. Jiří Švejcar

ohne sonstige Hilfe selbst durchgeführt und bei der Abfassung der Arbeit keine anderen als die in der Dissertation angeführten Hilfsmittel benutzt habe.
Ich habe bisher an keiner in -u. ausländischen medizinischen Fakultät bzw. Fachbereich ein Gesuch um Zulassung zur Promotion eingereicht, noch die vorliegende Arbeit als Dissertation vorgelegt.
Vorliegende Arbeit wurde bisher in keinem Publikationsorgan veröffentlicht.

Frankfurt am Main, den 25.III.83

Gabriela Roberto

A b s t r a c t

R O B O T K A , Gabriela

BIOCHEMISCHE VERÄNDERUNGEN DER MUCOPOLYSACCHARIDE IN GESUNDEN UND DIABETISCHEN PLAZENTEN WÄHREND DER ONTOGENESE

Die sauren MPS haben eine funktionelle Bedeutung in Hinsicht auf ihren möglichen Einfluß auf den plazentaren Austausch. (Glycoproteine stellen die größte Fraktion als Menge dar). Die verschiedene Änderungen in dem totalen Inhalt und im Verhältnis der MPS(Glycoproteine mit Keratansulfat, Hyaluronat, Heparansulfat, Chondroitin-4-sulfat, Chondroitin-6-sulfat, Dermatansulfat und Heparin) miteinander stehen offensichtlich unter dem Einfluß der Reifung der Plazenta. Zwischen den diabetischen und gesunden Plazenten besteht ein quantitativer Unterschied. In allen Plazenten wurden sämtliche Fraktionen festgestellt. Es ist nicht nur der Gesamt-MPS-Gehalt bei Neugeborenen aus einer diab. Schwangerschaft im Vergleich zum gesunden Neugeborenen evident höher, sondern auch alle Fraktionen bei neugeborenen Plazenten von diab. Müttern im Vergleich zu neugeborenen Plazenten aus gesunden Schwangerschaften. Weil in der Plazenta die MPS und Glykoproteine präsent sind, können sie gemeinsam an der Bildung der Plazentaschranke beteiligt sein. Die Gesamt-MPS und Glykoproteine nehmen mit Alter der Schwangerschaft ab, was für den Abbau der Plazentaschranke sprechen kann.
Mit Abnahme der Plazentaschranke können wahrscheinlich die mütterlichen Antikörper (Immunglobuline) gegen Ende der Schwangerschaft diese Barriere passieren. Dadurch, daß bei Diabetes mellitus der Spiegel der Gesamt-MPS und Glykoproteine im Verlauf der Schwangerschaft erhöht ist, kann die Passierbarkeit der Plazentaschranke eingeschränkt werden, was zur Behinderung des nötigen Stoffwechselaustausches (auch mütterl. Antikörper) führen kann. Bei Patienten mit Diabetes mellitus sind oft geschwächte Abwehrkräfte vorhanden.